

**Aus dem Institut für Chirurgische Forschung  
(Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin)  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Daphne Merkus**

**DIE BEDEUTUNG VON PLASMINOGEN-AKTIVATOR-  
INHIBITOR-1 (PAI-1) FÜR DEN ISCHÄMIE-  
REPERFUSIONSSCHADEN**



**DISSERTATION**

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Matthias Philipp Fabritius  
aus München

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Andreas Reichel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Schulz  
Prof. Dr. med. Reinhold Tiling

Mitbetreuung durch den  
habilitierten Mitarbeiter: Dr. med. Bernd Uhl

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2021

# Eidesstattliche Versicherung

Fabritius, Matthias Philipp

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

## **DIE BEDEUTUNG VON PLASMINOGEN-AKTIVATOR-INHIBITOR-1 (PAI-1) FÜR DEN ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 18.03.2021

Ort, Datum

Matthias Philipp Fabritius

Unterschrift Doktorandin/Doktorand



<b>I</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>11</b>
<b>1</b>	<b>Entzündung .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Ischämie-Reperfusion (I/R).....</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>Immunsystem .....</b>	<b>14</b>
3.1	Angeborenes Immunsystem .....	14
3.1.1	Granulozyten.....	15
3.1.2	Mononukleäres Phagozytensystem .....	16
3.1.3	Natürliche Killerzellen .....	17
3.1.4	Unspezifische humorale Abwehr.....	17
3.1.5	Angeborenes Immunsystem bei I/R .....	18
3.2	Erworbenes Immunsystem.....	19
3.2.1	T-Lymphozyten .....	19
3.2.2	B-Lymphozyten .....	20
3.2.3	Erworbenes Immunsystem bei I/R .....	20
3.3	Leukozytenrekrutierung.....	21
<b>4</b>	<b>Grundlagen der Thrombusbildung .....</b>	<b>24</b>
4.1	Primäre Hämostase .....	24
4.2	Sekundäre Hämostase.....	25
4.3	Immunthrombose .....	25
<b>5</b>	<b>Fibrinolytisches System .....</b>	<b>26</b>
5.1	Überblick .....	26
5.2	Nicht-fibrinolytische Eigenschaften des fibrinolytischen Systems .....	28
5.3	Rolle des fibrinolytischen Systems bei der I/R .....	29

<b>II</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>32</b>
<b>III</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>33</b>
<b>1</b>	<b>Genehmigung und Vorbemerkung .....</b>	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>Versuchstiere .....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>Narkose .....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b><i>In-vivo</i>-Modelle .....</b>	<b>34</b>
4.1	Chirurgische Verfahren und Injektionstechniken .....	34
4.1.1	Kaudalveneninjektion .....	34
4.1.2	Katheterisierung der <i>Arteria femoralis</i> .....	34
4.1.3	Präparation des <i>Musculus cremaster</i> .....	35
4.1.4	Stimulation des <i>Musculus cremaster</i> durch intraskrotale Injektion.. .....	35
4.1.5	I/R des <i>Musculus cremaster</i> .....	35
4.1.6	Warme I/R der Leber .....	36
4.1.7	Gewinnung und Transfer von Knochenmarksleukozyten .....	36
4.1.8	Depletion von neutrophilen Granulozyten .....	37
4.1.9	Blutentnahme und Tötung der Tiere .....	37
4.2	Intravitalmikroskopie (IVM) .....	38
4.2.1	Quantifizierung der Leukozytenmigration und hämodynamischer Parameter .....	39
4.2.2	Quantifizierung der Rekrutierung von fluoreszenzmarkierten Leukozyten nach Zelltransfer .....	40
4.2.3	Photochemisch-induzierte mikrovaskuläre Thrombusbildung .....	40
4.2.4	Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität .....	41

4.2.5	Mikrovaskuläre Fibrin(ogen) Ablagerung .....	41
<b>5</b>	<b>Ex-vivo- und in-vitro-Experimente .....</b>	<b>42</b>
5.1	Konfokalmikroskopie .....	42
5.2	Immunhistochemie .....	43
5.3	Bestimmung der makromolekularen Permeabilität von Endothelzellschichten .....	44
5.4	Durchflusszytometrie.....	44
5.5	Systemische Leukozytenzahl und Differentialblutbild .....	45
5.6	Leberenzyme .....	45
5.7	Zellviabilität von Hepatozyten .....	46
<b>6</b>	<b>Versuchsprotokolle.....</b>	<b>47</b>
6.1	I/R des Kremastermuskels .....	47
6.1.1	Analyse der Leukozytenrekrutierung im Kremastermuskel nach I/R .....	47
6.1.2	Analyse der mikrovaskulären Permeabilität im Kremastermuskel nach I/R .....	48
6.1.3	Versuchsgruppen.....	48
6.2	Stimulation des Kremastermuskels durch intraskrotale Injektion .....	49
6.2.1	Analyse der Leukozytenrekrutierung im Kremastermuskel nach intraskrotaler Stimulation.....	49
6.2.2	Analyse der mikrovaskulären Permeabilität im Kremastermuskel nach intraskrotaler Stimulation .....	50
6.2.3	Versuchsgruppen.....	50
6.3	Analyse der Rekrutierung von transfundierten fluoreszenzmarkierten Leukozyten im Kremastermuskel nach I/R.....	51
6.3.1	Versuchsablauf .....	51

6.3.2	Versuchsgruppen.....	52
6.4	I/R der Leber .....	52
6.4.1	Analyse des Gewebeschadens und der Leukozytenrekrutierung in der Leber nach I/R .....	52
6.4.2	Versuchsgruppen.....	53
6.5	Quantifizierung der mikrovaskulären Thrombusbildung .....	53
6.5.1	Versuchsablauf .....	53
6.5.2	Versuchsgruppen.....	53
<b>7</b>	<b>Statistische Versuchsauswertung .....</b>	<b>54</b>
<b>IV</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>55</b>
<b>1</b>	<b>Rolle von PAI-1 für die postischämische Leukozytenrekrutierung ....</b>	<b>55</b>
1.1	Verteilung von PAI-1 im postischämischen Gewebe.....	55
1.2	Einfluss von PAI-1 auf Rollen, feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten .....	58
1.3	Bedeutung von leukozytärem und nicht-leukozytärem PAI-1 für die postischämische Leukozytenrekrutierung .....	60
1.4	Phänotypisierung der transmigrierten Leukozyten .....	61
1.5	Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahlen .....	62
<b>2</b>	<b>Mechanismen der PAI-1 abhängigen Leukozytenrekrutierung .....</b>	<b>63</b>
2.1	Rolle des PAI-1 Rezeptors LRP-1 für die Regulation der postischämischen Leukozytenrekrutierung .....	63
2.2	Einfluss von PAI-1 auf die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen .....	65



<b>3</b>	<b>Einfluss von PAI-1 auf die postischämische mikrovaskuläre Permeabilität.....</b>	<b>69</b>
<b>4</b>	<b>Rolle von PAI-1 bei der warmen Ischämie der Leber .....</b>	<b>72</b>
<b>5</b>	<b>Rolle von PAI-1 bei der mikrovaskulären Thrombusbildung .....</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>Einfluss von PAI-1 auf die postischämische Ablagerung von Fibrin(ogen) nach I/R .....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>Wirkung des PAI-1-Inhibitors TM5275 auf die postischämische Leukozytenrekrutierung und Leberschädigung .....</b>	<b>77</b>
<b>V</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>79</b>
<b>1</b>	<b>Diskussion der verwendeten Methoden.....</b>	<b>79</b>
1.1	Versuchstiere .....	79
1.2	Versuchsmodelle.....	80
1.3	Intravitalmikroskopie .....	82
1.4	Durchflusszytometrie.....	83
1.5	Konfokalmikroskopie .....	84
<b>2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>84</b>
2.1	Bedeutung von PAI-1 für die Leukozytenrekrutierung im postischämischen Gewebe .....	84
2.2	Einfluss von leukozytärem und nicht-leukozytärem PAI-1 auf die Leukozytenrekrutierung .....	85
2.3	Charakterisierung der Mechanismen der PAI-1-abhängigen Extravasation von neutrophilen Granulozyten .....	86
2.4	Einfluss von PAI-1 auf die mikrovaskuläre Permeabilität .....	87
2.5	Auswirkung einer PAI-1-Blockade auf die Leukozytenrekrutierung und den Gewebeschaden der Leber nach I/R .....	88

## Inhaltsverzeichnis

2.6	Auswirkung eines PAI-1-Mangels auf die mikrovaskuläre Hämostase...	89
.....		
<b>VI</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>91</b>
<b>VII</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>93</b>
<b>VIII</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>97</b>
<b>IX</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>121</b>
<b>X</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>122</b>
<b>1</b>	<b>Aus der Dissertation hervorgegangene Publikationen.....</b>	<b>122</b>
<b>2</b>	<b>Weitere Publikationen.....</b>	<b>122</b>

### I Einleitung

#### 1 Entzündung

Die Entzündung oder Inflammation ist eine komplexe Reaktion des menschlichen Immunsystems auf schädliche Reize. Mechanische, chemische oder physikalische Reize sowie exogene Pathogene wie Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilze können zu einer Schädigung des menschlichen Organismus führen. Ziel der Entzündungsreaktion ist es den schädlichen Reiz zu eliminieren, geschädigte Zellen zu beseitigen und die Regeneration des Gewebes einzuleiten, auch wenn dabei eine vorübergehende Abnahme der Gewebefunktion in Kauf genommen wird. Die typischen Zeichen einer ablaufenden Entzündungsreaktion sind Rötung (*rubor*), Schwellung (*tumor*), Überwärmung (*calor*), Schmerz (*dolor*) und funktionelle Einschränkung (*functio laesa*) [1]. Eine Entzündungsreaktion kann an einem bestimmten Ort im Körper begrenzt ablaufen (lokal) oder den gesamten Organismus (generalisiert) betreffen. Zudem wird je nach zeitlichem Verlauf zwischen akuten und chronischen Entzündungen unterschieden [2].

Die akute Entzündungsreaktion kann als erste Verteidigungslinie gegen Verletzungen durch schädliche Reize angesehen werden. Die Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren im geschädigten Gewebe führt zu einer Vasodilatation, wodurch die Durchblutung gesteigert und die Blutflussgeschwindigkeit gesenkt wird. Durch eine Zunahme der Permeabilität von Endothelzellen der Mikrovaskulatur kommt es zum Austritt von Flüssigkeit und Proteinen aus dem Blutplasma. Gleichzeitig wird dadurch die Migration von Leukozyten aus den postkapillaren Venolen in das Gewebe gefördert (Extravasation), welche durch chemische Botenstoffe (Chemokine) an den Ort des schädlichen Reizes geleitet wird. Dort beseitigen die Leukozyten Pathogene und beschädigte Zellen mittels Phagozytose und leiten die Heilung des Gewebes ein. Die Entzündungsreaktion wird durch eine komplexe Kaskade von sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Mediatoren gesteuert. Durch eine zu schwache Entzündungsreaktion kann es zu einer ungenügenden lokalen Bekämpfung des schädlichen Reizes, wie beispielsweise einem pathogenen

Mikroorganismus, kommen, was wiederum zu schweren, lebensbedrohlichen Infektionen durch generalisierte Ausbreitung des Krankheitserregers im Körper führen kann. Eine überschießende Entzündungsreaktion kann wiederum zu einer länger anhaltenden Gewebedysfunktion und folglich zum Organversagen führen. Chronische Formen einer solch überschießenden Entzündungsreaktion spielen zum Beispiel in Erkrankungen wie der Arteriosklerose [3-6], der rheumatoiden Arthritis [7-11] oder Darmerkrankungen wie Morbus Chron und Colitis ulcerosa [12] eine zentrale Rolle. Akute Formen der überschießenden Entzündungsreaktion sind klinische Szenarien wie die Sepsis, wo eine akute, unregulierte Produktion von proinflammatorischen Mediatoren zu multiplen Organversagen und infolgedessen häufig zum Tod führen kann [13-15]. Eine Sonderform der akuten überschießenden Entzündungsreaktion ist der Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS).

## **2 Ischämie-Reperfusion (I/R)**

Der Ischämie-Reperusionsprozess ist einer der Hauptmechanismen für die Funktionsstörung und das Versagen von Organen nach Myokardinfarkt, Schlaganfall und Transplantation [16]. Er stellt eine Sonderform der aseptischen, also nicht durch exogene Pathogene ausgelösten, Entzündung dar. Auf eine initiale Ischämiephase folgt nach Wiederherstellung der Durchblutung eine Entzündungsexazerbation, welche zu zusätzlichen Gewebeschäden führen kann.

In der Ischämiephase kommt es durch eine Unterbrechung der Blutversorgung, beispielsweise durch einen arteriellen Thrombus oder bei Organtransplantationen durch Abklemmen von Gefäßen, zu einem lokalen Sauerstoffmangel und folglich einem sinkenden ATP-Spiegel in den betroffenen Zellen. Der intrazelluläre pH-Wert fällt infolge des anaeroben Stoffwechsels und der Laktatakkumulation ab. Nach einer gewissen Zeit kommt es zu einer Dysfunktion der ATP-abhängigen Ionenporter der Zellmembran, welche normalerweise das Membranpotential und damit die Zellintegrität aufrechterhalten [17]. Dadurch steigt die Konzentration von Calcium- und

Natriumionen in der Zelle. Calcium löst eine Reihe zellulärer Effekte aus, u.a. eine Aktivierung von endogenen Phospholipasen, was zur Schädigung der Zellmembran und durch Flüssigkeitseinstrom zur Zellschwellung führt [18]. Zellorganelle, wie die Mitochondrien, werden zersetzt und freie Radikale sowie reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) freigesetzt, wodurch es schließlich zum Zelltod kommt [17]. Das Ausmaß der Gewebeschädigung hängt stark von der Ischämiedauer ab [19].

Klinisch gesehen ist daher die Wiederherstellung der Durchblutung (Reperfusion) das primäre Therapieziel bei ischämischen Ereignissen, wenngleich es dadurch wiederum zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion mit konsekutiven Gewebeschaden kommen kann, das sogenannte „*reflow*-Paradoxon“ [20, 21]. Während der Ischämie durch Zelluntergang in den Extrazellularraum freigesetzte intrazelluläre Makromoleküle aktivieren das Immunsystems, welches normalerweise intrazellulären Makromolekülen nicht ausgesetzt ist und somit keine Immuntoleranz besteht. Gewebeständige Mastzellen und Makrophagen reagieren darauf mit Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren was u.a. zu einer Aktivierung der Endothelzellen und einer gesteigerten Permeabilität der Mikrozirkulation führt [22-25]. Durch die gesteigerte Präsentation von Adhäsionsmolekülen an der Endothelzelloberfläche sowie Ausschüttung von plättchenaktivierendem Faktor (PAF) kommt es im Rahmen der Reperfusion in der Mikrovaskulatur zu einer gesteigerten Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten [17, 24, 26, 27]. Aufgrund der erhöhten Gefäßpermeabilität und des konsekutiven Extrazellularödems steigt zusätzlich der Gewebedruck, was zu einem erhöhten Widerstand führt und damit den Blutfluss behindert. Die Folge ist ein „Verstopfen“ der kleinen Gefäße und ein erneuter postischämischer Perfusionsausfall („*no-reflow-phenomenon*“) [28, 29]. Bei der Reoxygenierung des ischämischen Gewebes kommt es zudem zu einem Anstieg von ROS, welche durch Oxidation des während der Ischämie akkumulierten ATP-Abbauprodukts Hypoxanthin entsteht [30]. ROS haben eine direkte zellschädigende Wirkung und regen zusätzlich die Extravasation von neutrophilen Granulozyten an [31-33]. Extravasierte neutrophile Granulozyten setzen wiederum ihrerseits reaktive Sauerstoffradikale, Proteasen und

proinflammatorische Botenstoffe frei was zu einer weiteren Schädigung des Gewebes führt [34].

### **3     Immunsystem**

Das Immunsystem ist ein körpereigenes Abwehrsystem, dessen Ziel es ist eingedrungene Pathogene zu erkennen und zu zerstören, entartete oder kaputte körpereigenen Zellen zu eliminieren und die Heilung von Gewebe zu induzieren. Dabei unterscheidet man angeborene, unspezifische und erworbene, spezifische Abwehrmechanismen [35, 36]. Beide Mechanismen verfügen über zelluläre Komponenten, die Leukozyten, und humorale, nicht-zelluläre Komponenten. Leukozyten werden primär im Knochenmark gebildet, wo sie aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen und sich in weitere Subpopulationen differenzieren. Die Ausreifung der Zellen findet teils im Knochenmark, teils in anderen Organen statt.

#### **3.1    Angeborenes Immunsystem**

Effektorzellen der angeborenen Abwehr sind Granulozyten, Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS), Mastzellen und natürliche Killerzellen. Zur humoralen Komponente zählen verschiedenen Proteine und Signalsubstanzen. Auch die Deckflächen der Haut und Schleimhäute mit ihren Barrierefunktionen werden zur unspezifischen Abwehr gezählt. Ziel der angeborenen Abwehr ist es innerhalb von Minuten eingedrungene Pathogene zu erkennen und zu eliminieren, ohne eine größere inflammatorische Reaktion auszulösen. Primär sind hierbei gewebeständige Mastzellen und Makrophagen beteiligt, welche bei Bedarf Phagozyten, wie neutrophile Granulozyten oder Monozyten und natürliche Killerzellen über die Blutbahn zum Ort der Infektion rekrutieren können.

### 3.1.1 Granulozyten

Entsprechend der Kernmorphologie und des Färbeverhaltens des Zytoplasmas unterscheidet man neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Sie werden im Knochenmark gebildet und an das Blut abgegeben. Dort haben sie eine Lebenszeit von wenigen Stunden (neutrophile Granulozyten) bis zu 1-2 Wochen (eosinophile und basophile Granulozyten) [36, 37].

Neutrophile Granulozyten sind phagozytosebefähigt und haben dadurch eine entscheidende Bedeutung in der Bekämpfung von Bakterien [38]. Bei einer akuten Entzündungsreaktion sind sie die ersten Zellen die vor Ort rekrutiert werden. Dazu werden die im Blut zirkulierenden Zellen mit chemotaktischen Botenstoffen, wie Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin-1 $\beta$  angelockt, welches von aktivierten gewebeständigen Makrophagen sezerniert wird [39]. Am Entzündungsherd interagieren neutrophile Granulozyten in den postkapillaren Venolen über Adhäsionsmoleküle (Selektine, Selektinliganden, Integrine) mit aktivierten Endothelzellen, woraufhin es in mehreren Schritten zu einer Rekrutierung der Leukozyten (Vgl. II/3.3) in das perivaskuläre Gewebe kommt [40-42]. Dort wandern sie entlang eines chemotaktischen Gradienten zum Ort des Geschehens, um das Pathogen zu eliminieren, wofür ihnen unterschiedliche „Waffen“ zur Verfügung stehen. Zum einen phagozytieren sie Pathogene und töten sie mit Hilfe von NADPH-Oxygenase-abhängigen Mechanismen (ROS) sowie antibakteriellen Proteinen (Cathepsine, Defensine, Laktoferrin und Lysozym) ab [43-45]. Die antibakteriellen Proteine werden aus den neutrophilen Granula dabei entweder in Phagosomen oder in das extrazelluläre Milieu freigesetzt und wirken so auf intra- und extrazelluläre Pathogene. Zusätzlich können neutrophile Granulozyten Bakterien und Pilze durch die Ausbildung von extrazellulären Netzen (NETs für *neutrophil extracellular traps*) unschädlich machen [46]. NETs werden von den neutrophilen Granulozyten aktiv gebildet, wobei sie selbst absterben (NETose). Sie bestehen aus freigesetzter DNS, an die Histone und Enzyme, welche aus neutrophilen Granula freigesetzt werden, gebunden sind. NETs immobilisieren Krankheitserreger und verhindern so deren Ausbreitung und erleichtern zusätzlich auch die anschließende Phagozytose der

gefangenen Mikroorganismen. Zusätzlich nimmt man an, dass sie Krankheitserreger direkt durch antimikrobielle Histone und Proteasen eliminieren [47-49]. Neben den physiologischen Eigenschaften vermutet man, dass NETs auch bei pathophysiologischen Prozessen wie der atherosklerotischen Plaquebildung und der arteriellen Thrombose eine wichtige Rolle spielen [50].

Eosinophile Granulozyten übernehmen vor allem in der Abwehr von Würmern und anderen Parasiten eine wichtige Rolle. Sie setzen nach Bindung von IgE oder IgG zytotoxisch wirkende Substanzen frei, welche das Pathogen lähmt und abtötet [51, 52]. Zudem sind sie entscheidend in der Pathogenese von atopischen Erkrankungen beteiligt [53, 54].

Basophile Granulozyten spielen ebenfalls bei allergischen Reaktionen sowie Abwehr von Parasiten eine Rolle und sind in vielen Eigenschaften verwandt mit den Mastzellen, einer weiteren Zellart des angeborenen Immunsystems. Beide Zelltypen sezernieren eine Reihe an größtenteils proinflammatorischen Mediatoren wie beispielsweise vasoaktives Histamin [55, 56].

### **3.1.2 Mononukleäres Phagozytensystem**

Zellen des MPS sind zur Phagozytose befähigt und sind damit einerseits in der Lage Pathogene zu bekämpfen, andererseits aufgenommene Antigene nach proteolytischem intrazellulären Abbau an ihrer Zelloberfläche zu präsentieren, was wiederum die Zellen des spezifischen Immunsystems aktiviert. Zudem sind sie in der Lage Zytokine, Chemokine, Proteasen und Wachstumshormone zu sezernieren, was ihnen eine wichtige Funktion in der Modulation von Immunreaktionen gibt [57]. Dabei gibt es verschiedene Subtypen, die eine teils eher pro-inflammatorisch, teils eher anti-inflammatorische Aktivität aufweisen [58]. Vorläuferzellen sind Monozyten, welche vom Knochenmark ins Blut abgegeben werden, um daraufhin in verschiedene Gewebe einzuwandern und sich dort zu residenten Makrophagen differenzieren [59]. In den verschiedenen



## Einleitung

Organen bilden sich spezialisierte Subtypen aus, welche eine Überlebenszeit von mehreren Monaten haben.

### **3.1.3 Natürliche Killerzellen**

Natürliche Killerzellen stammen aus lymphoiden Progenitorzellen ab und sind an der frühen Bekämpfung von virusinfizierten oder entarteten Zellen beteiligt [60, 61]. Im Gegensatz zu B- oder T-Lymphozyten besitzen sie keinen Rezeptor welcher spezifischen Antigene erkennt, sondern identifizieren potenzielle Zielzellen lediglich an fehlendem oder verändertem MHC-I an der Zelloberfläche (Vgl. II/3.2.1) und töten diese mittels Freisetzung von Perforinen und Granzymen aus ihren Granula ab. Zudem haben sie durch die Freisetzung von Zytokinen TNF und Interferon- $\gamma$  immunmodulatorische Funktionen [62].

### **3.1.4 Unspezifische humorale Abwehr**

Zur unspezifischen humoralen Abwehr zählen verschiedenen Proteine und Signalsubstanzen (Zytokine). Das Protein Lysozym kommt in vielen Körperflüssigkeiten vor und kann Zellwände von Pathogenen enzymatisch spalten und sie damit, bevor sie weiter in den Körper eindringen, abtöten [63]. Bestimmte Zytokine wie Interferone oder TNF nehmen Einfluss auf die zelluläre Proteinbiosynthese und tragen zusammen mit Interleukinen auch direkt zur Zellaktivierung und -differenzierung bei. Chemokine sind chemische Lockstoffe die entscheidend für die Migration von Immunzellen zum Entzündungsherd sind [64, 65]. All diese Stoffe werden von vielen verschiedenen Zellen des Körpers, vor allem von Immunzellen, gebildet und sind wichtige Mediatoren bei immunologischen Reaktionen und Entzündungsprozessen [66].

Das Komplementsystem wird ebenfalls der unspezifischen humoralen Abwehr zugeordnet. Es besteht aus mehr als 30 Plasmaproteinen, welche komplementär zu spezifischen Antikörpern wirken [67, 68]. Sie binden an Zelloberflächen und induzieren eine Enzymkaskade was zur Zerstörung der Zielzelle führt. Darüber

hinaus haben sie opsonierende Eigenschaften und wirken als Chemokine, was wiederum andere Immunzellen aktiviert. Sie sind primär für die schnelle Bekämpfung von Pathogenen zuständig, tragen jedoch unreguliert durch ihre zellzerstörende Wirkung in der Pathogenese vieler Krankheiten zu Gewebeschäden bei [69-72].

### **3.1.5 Angeborenes Immunsystem bei I/R**

In der Literatur herrscht Einigkeit darüber, dass neutrophilen Granulozyten eine zentrale Rolle beim IRS zukommt [17, 27, 73, 74]. In der Reperfusionsphase kommt es durch Interaktion mit den aktivierten Endothelzellen zur Adhäsion von neutrophilen Granulozyten in den postkapillären Venolen und anschließend zu einer massiven Rekrutierung in das postischämische Gewebe [75]. Dort sezernieren sie eine Vielzahl von gewebeschädigenden Stoffen wie ROS, Proteasen oder Zytokine und führen zudem durch die Produktion von Interleukin-17 zu einer Aktivierung von natürlichen Killer-T-Zellen [76]. Eine Depletion von neutrophilen Granulozyten oder eine Blockade der Endothelzellinteraktion haben in vielen Studienmodellen einen protektiven Effekt auf den IRS gezeigt und scheinen ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zu sein [77-81].

Eosinophile Granulozyten scheinen im IRS eine untergeordnete Rolle zu spielen, jedoch lassen neuere Studien darauf schließen, dass sie eine wichtige Rolle im Heilungsprozess nach I/R haben [82, 83]. Basophile Granulozyten haben, ähnlich wie Mastzellen vermutlich eine primär regulatorische Funktion [17].

Durch die verschiedenen Subtypen und ihre wichtige Funktion in der Modulation von Immunreaktionen, haben Zellen des MPS einen großen Einfluss auf den IRS sowie den anschließenden Heilungsprozess [17, 24, 84, 85]. Insbesondere das vorwiegend von Makrophagen produzierte Zytokin TNF nimmt eine wichtige proinflammatorische Rolle in der initialen Phase ein, indem es die lokale Produktion von Chemokinen und ROS steigert als auch Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B aktiviert. In Endothelzellen führt das zu einer vermehrten Expression

von Adhäsionsmolekülen und damit zur gesteigerten Leukozytenaktivierung und -rekrutierung [17].

Das Komplementsystem trägt ebenfalls nachgewiesenermaßen zum Gewebeschaden bei I/R bei [86, 87], spielt jedoch für die in dieser Arbeit untersuchten Mechanismen eine untergeordnete Rolle.

### **3.2 Erworbenes Immunsystem**

Die erworbene Abwehr wird erst verzögert aktiv, bekämpft eingedrungene Pathogene dafür deutlich spezifischer. Zu den Zellen der erworbenen Abwehr werden antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen oder dendritische Zellen sowie Lymphozyten, wo zwischen T- und B-Lymphozyten unterschieden wird, gezählt [88]. Lymphozyten reifen, nach Bildung im Knochenmark, in den primären lymphatischen Organen (Thymus und Knochenmark) aus und wandern dann teilweise in sekundäre lymphatische Gewebe (Lymphknoten, Milz, mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe) ein. Ein entscheidendes Merkmal ist, dass sie zwischen „eigen“ und „fremd“ unterscheiden können, was im Gegensatz zu den Zellen des angeborenen Immunsystems eine zielgerichtete Reaktion auf schädliche Reize zulässt.

#### **3.2.1 T-Lymphozyten**

Für die spezifische zelluläre Abwehr sind primär die T-Zellen verantwortlich, welche nach der Ausreifung im Thymus mittels T-Zell-Rezeptoren Antigene an Zelloberflächen erkennen, die von Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen (MHC) I und II präsentiert werden. MHC-I-Moleküle kommen mit Ausnahme der Erythrozyten auf allen körpereigenen Zellen vor, MHC-II-Moleküle kommen auf antigenpräsentierenden Zellen vor [89]. T-Zellen lassen sich anhand von Oberflächenmarkern und Funktion in Subpopulationen einteilen [90, 91]. CD4-positive, sogenannte T-Helferzellen, erkennen exogene Antigene nur in

Verbindung mit MHC-II-Molekülen und haben primär regulatorische Aufgaben. Sie verstärken die Immunantwort durch die Sekretion von Zytokinen wie Interferon- $\gamma$ , was zu einer Aktivierung von Makrophagen führt, oder Interleukin-4 und -10 was über die Aktivierung von B-Lymphozyten die Antikörperproduktion induziert [92]. CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten erkennen Antigenbruchstücke in Verbindung mit MHC-I-Molekülen auf infizierten, körperfremden oder veränderten, beispielsweise entarteten, Zellen und zerstören diese nach Bindung durch Ausschüttung von Perforinen und Granzymen [93, 94]. Ferner gibt es weitere Unterformen, welche primär regulatorische Aufgaben übernehmen.

### **3.2.2 B-Lymphozyten**

B-Lymphozyten besiedeln nach der Ausreifung im Knochenmark sekundär lymphatische Organe und können dort mithilfe von Immunglobulinen (Antikörpern) auf ihrer Oberfläche freie Antigene erkennen. Nachdem sie durch Antigenbindung aktiviert werden, proliferieren sie und differenzieren zu Immunglobulin-produzierenden Plasmazellen [35]. Jede Plasmazelle kann nur einen spezifischen Antikörper produzieren, welcher wiederum nur mit einem spezifischen Antigen reagiert. Neben den Plasmazellen entstehen nach Antigenkontakt auch Gedächtniszellen, welche über Jahre in lymphatischen Geweben verweilen. Nach erneutem Antigenkontakt differenzieren sie zu Plasmazellen und lösen so eine schnellere spezifische Immunantwort aus [95, 96].

### **3.2.3 Erworbenes Immunsystem bei I/R**

Mehrere Studien haben die Rolle von Lymphozyten im IRS untersucht, mit teils widersprüchlichen Ergebnissen. Während sich eine B-Zell-Depletion in manchen Studien protektiv auf den IRS in Niere und Darm auswirkte, zeigten andere Studien genau das Gegenteil [97-100].

Eine Defizienz an T-Lymphozyten hat in Studien protektive Effekte nach I/R gezeigt [101-103]. Gleichzeitig konnte in mehreren anderen Untersuchungen ein protektiver Effekt von regulatorischen T-Lymphozyten im IRS der Niere und Gehirn nachgewiesen werden [104-109]. Eine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine Defizienz an T-Lymphozyten als auch eine Defizienz an B-Lymphozyten den IRS in der Niere im Mausmodell reduzieren, während die kombinierte Defizienz an B- und T-Lymphozyten keinen protektiven Effekt aufwies, was auf eine komplexe Interaktion zwischen den verschiedenen Lymphozyten im IRS hinweist [110].

Man kann insgesamt davon ausgehen, dass der Effekt der Lymphozyten im IRS je nach Phase divergiert und stark zwischen den jeweiligen Subpopulationen variiert [111, 112]. Zudem spielen Lymphozyten vermutlich auch eine wichtige Rolle im Heilungsprozess nach I/R [113].

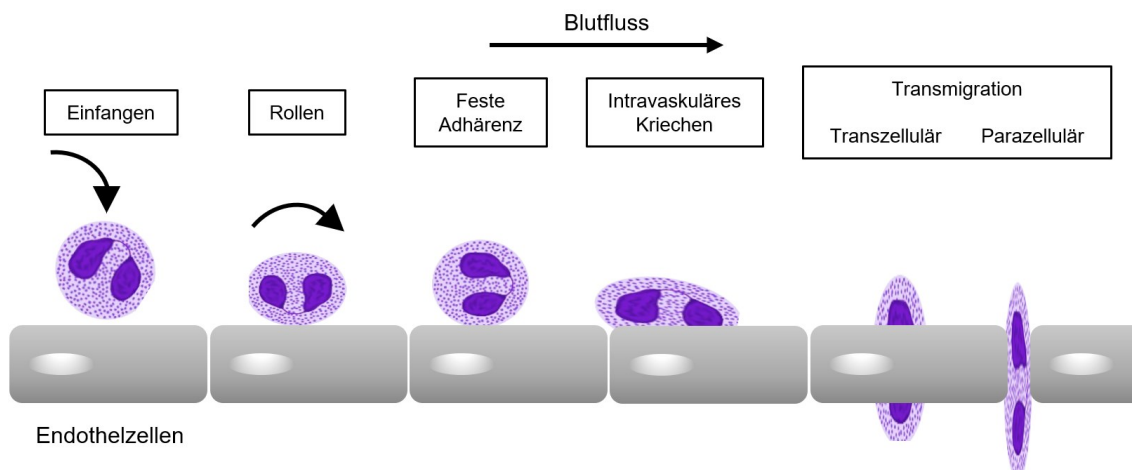
### 3.3 Leukozytenrekrutierung

Ein Schlüsselereignis in der Entzündungsreaktion beim IRS ist die Rekrutierung von intravasalen Leukozyten, insbesondere neutrophilen Granulozyten, in das postischämische Gewebe [40]. Dieses Ereignis findet vorwiegend an der Gefäßwand postkapillarer Venolen statt. Bei der Ischämie-induzierten Gewebeschädigung sezernieren residente Makrophagen proinflammatorische Zytokine wie zum Beispiel TNF und IL-1 $\beta$ . Diese Zytokine und freigesetzte Sauerstoffradikale aktivieren Endothelzellen, welche daraufhin endoluminal vermehrt Oberflächenadhäsionsmoleküle sowie chemotaktische Zytokine exprimieren [41, 48, 114]. Zirkulierende Leukozyten beginnen nun mit dem Endothel zu interagieren. Im ersten Schritt werden Leukozyten eingefangen und Rollen in der Folge auf den Endothelzellen entlang des Blutstroms. Dieser Prozess wird primär über Selektine gesteuert, welche mit ihren Liganden interagieren [115]. Endothelseitig exprimiertes P-Selektin und E-Selektin binden ihren wichtigsten Liganden PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) an der

Leukozytenoberfläche, was den Leukozyten ermöglicht, trotz der Scherkräfte des Blutflusses am entzündeten Endothel zu haften [116, 117]. Zusätzlich führt die Wechselwirkung von PSGL-1 mit L-Selektin, welches von den meisten Leukozyten exprimiert wird, zu einer Leukozyten-Leukozyten-Interaktion, wodurch weitere Leukozyten eingefangen werden [118, 119]. In den rollenden Leukozyten werden nun durch obengenannte Wechselwirkung sowie Bindung von Chemokinen Tyrosin- und MAP-Kinase (MAPK für *mitogen-activated protein kinase*)-abhängige intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, was zu einer Konformationsänderung von membranständigen Integrinen führt [120-125]. Hierbei spielt u.a. die Tyrosinkinase SYK (*spleen tyrosin kinase*) eine wichtige Rolle [126-128]. Die Aktivierung und folgende Konformationsänderung wird zusätzlich durch endothelial an Glykosaminoglykane gebundene Chemokine verstärkt [129-133]. Die hochaffinen Integrine binden nun endothelseitige Moleküle was zum Stillstand und zur festen intraluminalen Adhärenz der Leukozyten führt. Hier sind vorrangig die Integrine VLA-4 (*very late antigen 4*, auch  $\alpha 4 \beta 1$ -integrin), welches mit VCAM-1 (*vascular cell-adhesion molecule 1*) interagiert, sowie LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*, auch  $\alpha L \beta 2$ -integrin) und Mac-1 (*macrophage-1 antigen*, auch  $\alpha M \beta 2$ -integrin), welche vorrangig mit ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) interagieren, involviert [134-138]. Im nächsten Schritt kriechen („*crawling*“) die Leukozyten MAC1/ICAM-1-anhängig auf dem Endothel, bis sie die geeignete Stelle zur Transmigration finden [139-141]. Wegweisend sind hierbei luminal präsentierte Chemokine [142]. Die Transmigration kann entweder transzellulär (durch die Endothelzelle) oder parazellulär (zwischen zwei Endothelzellen) erfolgen, wobei neutrophile Granulozyten vorzugsweise den parazellulären Weg nehmen [143-146]. Die Transmigration von neutrophilen Granulozyten wird durch Wechselwirkungen zwischen den Integrinen LFA-1, Mac-1, VLA-4, PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*) und CD99 in den Neutrophilen sowie den Adhäsionsmolekülen ICAM-1, ICAM-2, JAMs (*junctional adhesion molecules*), PECAM-1 und CD99 auf den Endothelzellen vermittelt [147]. Durch die Leukozyten-Endothel-Interaktion und ein verändertes Genexpressionsmuster von aktivierten Endothelzellen, kommt es zu einer Auflockerung der Endothelzell-Endothelzell-Junktionsmoleküle, was die Transmigration der Leukozyten

## Einleitung

erleichtert [41, 148]. Während der Transmigration geben neutrophile Granulozyten zusätzlich Elastase ab, was die Junctionsmoleküle weiter abbaut [137, 143, 146]. Nachdem die Leukozyten die Endothelzellschicht durchdrungen haben, müssen sie den Raum zwischen und Basalmembran und Perizyten überwinden. Die Basalmembran ist ein Proteinnetzwerk aus Kollagenen und Lamininen, der extrazellulären Matrix (EZM), welche über Molekülbindungen miteinander verknüpft sind. Neutrophile Granulozyten beherbergen spezifische Gruppen von Proteasen, wie Matrix-Metalloproteinasen (MMP) oder Serinproteasen (Cathepsin G, neutrophile Elastase und Proteinase 3), die enzymatische Aktivität gegen die Moleküle der EZM besitzen [40, 149-151]. Perizyten sind kontraktile Perivaskularzellen, die sich um Endothelzellen wickeln und scheinen eine wichtige Rolle in der Navigation von neutrophilen Granulozyten zu haben [152-154]. Sie wandern entlang der Perizyten-schicht („abluminales Kriechen“) um von dort tiefer ins Gewebe vorzudringen, wobei Chemokingradienten und Lipidmediatoren wie Leukotrien B4 (LTB4) oder PAF die Migrationsrichtung bestimmen [155, 156]. In **Abbildung 1** sind die Teilschritte der Leukozytenrekrutierung am Beispiel eines neutrophilen Granulozyten schematisch dargestellt.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Teilschritte der Leukozytenrekrutierung.

## **4 Grundlagen der Thrombusbildung**

Um nachfolgend das fibrinolytische System zu verstehen, soll ein kurzer Überblick über die Hämostase gegeben werden. Die Hämostase ist ein wichtiger biologischer Vorgang, welcher Verletzungen der Blutgefäße und dadurch entstehende Blutungen rasch entgegenwirkt. Man unterscheidet dabei die primäre, zelluläre und sekundäre, plasmatische Hämostase, welche miteinander in enger Wechselwirkung stehen.

### **4.1 Primäre Hämostase**

Effektorzellen der primären Hämostase sind die Blutplättchen (Thrombozyten). Thrombozyten sind Zellfragmente, welche durch Abschnürung aus Megakaryozyten im Knochenmark entstehen und in großer Zahl im Blutkreislauf vorhanden sind. Bei einer Gefäßverletzung heften sich im Blut zirkulierende Thrombozyten an frei gelegte subendotheliale Kollagenfasern. Dies passiert durch die Wechselwirkung von endotheliale von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibronectin und Laminin mit dem Rezeptorkomplex Glykoprotein GPIIb/IIIa der Thrombozytenmembran. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten [157, 158]. Es folgt die Sekretion von Inhaltsstoffen der Thrombozytengranula wie Adenosindiphosphat (ADP), Calcium-Ionen, Serotonin und Thromboxan A<sub>2</sub> was weitere Thrombozyten anlockt und aktiviert. Es kommt zu einer Vasokonstriktion, um den Blutzufluss zu drosseln. Zusätzlich verformen sich die initial glatten, scheibenförmigen Thrombozyten zu kugelförmigen Gebilden mit langen Fortsätzen, sogenannte Pseudopodien, mit deren Hilfe sich aktivierte Thrombozyten untereinander verzahnen. Der auf der Zellmembran von aktivierten Thrombozyten bereitgestellte Rezeptorkomplex GPIIb/IIIa bindet an Plasmafibrinogen und an aus thrombozytären  $\alpha$ -Granula freigesetzten „Haftstoffe“ (Fibronectin, Thrombospondin, vWF), was innerhalb kürzester Zeit zur Ausbildung eines Thrombozytenaggregats, des sog. „weißen Thrombus“,



führt. Der gesamte Prozess dauert nur wenige Minuten und führt zur initialen Blutstillung.

### 4.2 Sekundäre Hämostase

In der sekundären Hämostase wird der labile Thrombozytenthrombus durch Fibrin und die Einlagerung von Erythrozyten stabilisiert und folglich als „roter Thrombus“ bezeichnet. Dieser Prozess wird auch Gerinnungskaskade genannt und lässt sich in drei Phasen unterteilen [159-161]. In der Aktivierungsphase wird eine durch Serinproteasen katalysierte Kaskade angestoßen, wobei Vorläuferenzyme, sogenannte Gerinnungsfaktoren, wiederum andere Gerinnungsfaktoren aktivieren und am Ende Prothrombin zu Thrombin gespalten wird. In der darauffolgenden Koagulationsphase spaltet Thrombin inaktives Fibrinogen in einzelne Fibrinmoleküle, welche sich durch die Wirkung des aktivierten Faktor XIIIa zu stabilen Fibrinpolymeren zusammenschließen. Diese lagern sich in der Retraktionsphase mittels des Membranrezeptors GPIIb/IIIa an den Thrombozytenthrombus an und quervernetzen diesen. Zirkulierende Erythrozyten lagern sich in das Maschenwerk ein und es kommt zu einer zunehmenden Kontraktion der Thrombozyten, wodurch sich der Thrombus zusammenzieht und weiter verfestigt.

### 4.3 Immunthrombose

Die Immunthrombose bezeichnet eine angeborene Immunantwort, welche durch das Zusammenspiel des angeborenen Immunsystems und den Prozessen der Blutgerinnung zu einer Abwehr von intravaskulären Pathogenen führt [162-164]. Dabei bilden sich insbesondere in Mikrogefäßen Thromben, die mit Immunzellen ein intravaskuläres Gerüst bilden, welches die Erkennung, Eindämmung und Zerstörung von Krankheitserregern erleichtert. Durch die Interaktion von Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen, u.a. über P-Selektine, PSGL-1 und GPIIb $\alpha$ , kommt es unter Einbeziehung von *tissue factor* zur Entstehung eines

Thrombus und Aktivierung der Gerinnungskaskade. Hierbei sind insbesondere neutrophile Granulozyten und Makrophagen involviert, jedoch konnte zuletzt gezeigt werden, dass auch eosinophile Granulozyten eine Rolle spielen [165-168]. Durch neutrophile Granulozyten gebildete NETs verstärken die Gerinnungskaskade, aktivieren weitere Thrombozyten und führen so zu einer Kompartimentalisierung von Krankheitserregern. Die Ausbreitung des Pathogens wird dadurch behindert und die lokale Bekämpfung erleichtert (Vgl. I/3.1.1) [162, 169, 170]. Während der Immunthrombose ist die Pathogen-Bekämpfung auf das intravaskuläre Kompartiment beschränkt und führt somit nur zu einer minimalen Schädigung des Parenchyms des Organismus. Eine Dysregulation der Immunthrombose kann jedoch zu ausgedehnten Organschäden bis hin zum Organversagen führen und scheint eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von thrombotischen Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt, der disseminierten intravasalen Koagulopathie bei Sepsis oder der tiefen Venenthrombose zu spielen [162, 171-174].

## 5 Fibrinolytisches System

### 5.1 Überblick

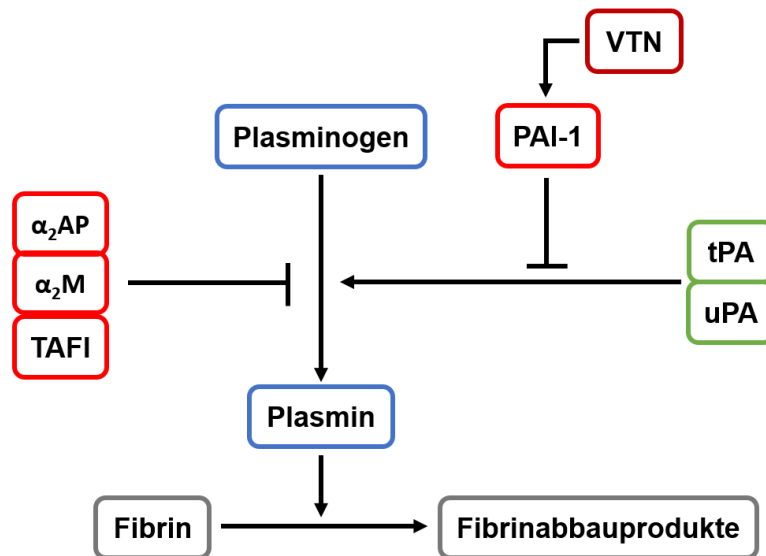
Die Fibrinolyse ist ein grundlegender biologischer Prozess, welcher als Gegenspieler der Hämostase die unnötige Akkumulation von intravaskulärem Gerinnungsprodukten verhindert als auch Blutgerinnsel auflöst und somit die Gewebepfusion aufrechterhält [175]. Die Serinprotease Plasmin ist der wichtigste Effektor im fibrinolytischen System, welcher die Auflösung von Fibrinpolymeren vermittelt. Sein Zymogen Plasminogen, welches in der Leber gebildet wird, wird von *tissue-type plasminogen activator* (tPA; gewebespezifischer Plasminogenaktivator) und Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) durch hydrolytische Spaltung aktiviert [176, 177].

Endothelzellen setzen kontinuierlich limitiert aktive Einzelstrang-tPA frei, welche in Anwesenheit von Fibrin aktiviert wird und zur gesteigerten Plasminogenspaltung führt. Enzymatisch weitgehend inaktive Einzelstrang-uPA (pro-uPA) wird in deutlich geringeren Mengen ebenfalls durch das Endothel

## Einleitung

sezerniert. Über Feedbackmechanismen kann aktives Plasmin die Einzelstrangform von tPA und uPA in die enzymatisch deutlich aktivere Doppelstrangform spalten.

Der den Serpinen zuzuordnendem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) ist der Hauptinhibitor der Plasminogenaktivatoren, welcher eine übermäßige fibrinolytische Aktivität verhindert [178]. Er bildet ein Pseudosubstrat für die Plasminogenaktivatoren, um deren proteolytische Aktivität durch Komplexbildung zu senken [179]. PAI-1 wird von Hepatozyten und mikrovaskulären Endothelzellen ausgeschieden und zirkuliert im Blut hauptsächlich in Thrombozyten, wo es im Rahmen der Thrombozytenaktivierung während einer Gerinnungsphase vermehrt sezerniert wird [180, 181]. Er weist grundsätzlich eine kurze Halbwertszeit auf, da seine reaktiven Mittelschleife spontan in das Hauptblatt des Moleküls inseriert, wodurch es inaktiv wird [182, 183]. Dieser Übergang in die inaktive (latente) Form wird durch Bindung an das Glykoprotein Vitronektin (VTN), welches sowohl im Plasma als auch in der extrazellulären Matrix vorhanden ist, verlangsamt und aktives PAI-1 und seine Funktion dadurch stabilisiert [184-189]. Weitere antifibrinolytisch wirksame Moleküle sind die direkten Plasmininhibitoren  $\alpha$ 2-Makroglobulin ( $\alpha$ 2M),  $\alpha$ 2-Antiplasmin ( $\alpha$ 2AP), und der Thrombin-aktivierbarer-Fibrinolyse-Inhibitor (TAFI) [190-192]. **Abbildung 2** zeigt eine schematische Darstellung des fibrinolytischen Systems.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des fibrinolytischen Systems.  $\alpha_2$ AP,  $\alpha_2$ -Antiplasmin;  $\alpha_2$ M,  $\alpha_2$ -Makroglobulin; PAI-1, Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1; TAFI, Thrombin-aktivierbarer-Fibrinolyse-Inhibitor; tPA, *tissue-type plasminogen activator* (gewebespezifischer Plasminogenaktivator); uPA, Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator; VTN, Vitronectin.

## 5.2 Nicht-fibrinolytische Eigenschaften des fibrinolytischen Systems

Neben ihrer bekannten Rolle in der Fibrinolyse sind die obengenannten Moleküle des fibrinolytischen Systems, als auch deren Substrat Fibrin(ogen) in zahlreiche andere physiologische und pathophysiologische Prozesse, beispielsweise Entzündungsreaktion, Tumormetastasierung, Wundheilung und Angiogenese involviert [193-196].

Plasmin spaltet als proteolytisches Enzym direkt und indirekt (über die Aktivierung von MMP) Bestandteile der extrazellulären Matrix und Zelladhäsionsmoleküle wie E-Cadherin, was die Migration von Leukozyten und Tumorzellen erleichtert und die mikrovaskuläre Permeabilität steigert [176, 197, 198]. Die aktivierten MMP wiederum beeinflussen durch enzymatische Spaltung direkt die Funktion und Aktivität von diversen Zytokinen und deren Rezeptoren [199-203]. Plasmin steigert auch die Aktivität des wichtigsten humanen Lockstoffs von neutrophilen Granulozyten, IL-8 bzw. CXCL8, durch translationale Modifikationen und aktiviert das Komplementsystem durch Interaktion mit den

Komplementfaktoren C3 und C5 [204, 205]. Des Weiteren kann Plasmin die biologische Aktivität von Thrombopoetin senken, einem Hormon das Einfluss auf die Produktion von Thrombozyten hat, sowie die Erythropoese und Myelopoese über Beeinflussung von Wachstumshormonen reguliert [206]. Die übrigen Moleküle des fibrinolytischen Systems haben einerseits durch Modulation der Plasminaktivität Einfluss auf diese Vorgänge, andererseits nehmen sie auch direkten Einfluss auf bestimmte Prozesse im Körper. So konnten Studien unter anderem zeigen, dass beispielsweise PAI-1 direkt über seine VTN-bindende Eigenschaft und indirekt über die Hemmung von Plasmin einen Einfluss auf die Angiogenese und Tumorgenese hat [178, 207-210]. Ferner koordiniert PAI-1 über die Interaktion mit dem LRP (*low density lipoprotein receptor-related protein*)-Rezeptor zusammen mit tPA die Mac-1-abhängige Migration von Makrophagen [211]. Auch uPA spielt zusammen mit seinem Rezeptor uPAR (*urokinase-type plasminogen activator receptor*) eine Rolle in diversen physiologischen und pathophysiologischen Abläufen, unter anderem durch die Beeinflussung der Leukozytenrekrutierung [212-216].

### 5.3 Rolle des fibrinolytischen Systems bei der I/R

Insbesondere der Einfluss des fibrinolytischen Systems auf Entzündungsvorgänge wurde in vielen Studien untersucht und es wird mittlerweile angenommen, dass das inflammatorische und das fibrinolytische System eng miteinander verbunden sind und sich gegenseitig stark beeinflussen [217]. So konnte auch gezeigt werden, dass die verschiedenen Faktoren des fibrinolytischen Systems in der Pathogenese des IRS und des darauffolgenden Heilungsprozesses unterschiedlicher Organe involviert sind.

Im Tiermodell konnte nach einer fokalen zerebralen Ischämie und Reperfusion immunohistochemisch eine im Vergleich zur kontralateralen Seite deutlich gesteigerte Plasminogenaktivierung in der ischämischen Hemisphäre nachgewiesen werden [218]. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass nach Suppression der fibrinolytischen Aktivität durch Tranexamsäure, einem synthetischen Plasmin- und tPA-Inhibitor, ein geringer ausgeprägtes

Lungenödem nach pulmonaler I/R auftrat [219]. Des Weiteren beobachtete man nach Verabreichung des Serinprotease-Inhibitors Aprotinin und I/R des Myokards eine signifikant reduzierte Leukozyteninfiltration in das postischämische Gewebe und verringerte Apoptoseraten der Kardiomyozyten. Die Genexpressionsanalyse zeigte eine Suppression proinflammatorischer Gene u.a. eine verminderte Expression von ICAM-1 und TNF [220]. Unsere Arbeitsgruppe konnte in vorausgegangenen Studien verschiedene Mechanismen von Plasmin im IRS analysieren. Zirkulierendes Plasmin(ogen) extravasiert in der initialen Reperusionsphase in das Gewebe und aktiviert residente proinflammatorische Mastzellen. Diese setzen vermehrt Mediatoren wie LTB<sub>4</sub> und PAF frei, welche zur gesteigerten Adhärenz und Transmigration von neutrophilen Granulozyten führen. Zusätzlich unterstützt Plasmin und von Plasmin aktivierte MMP die Leukozytenmigration durch Initiierung von Umbauprozessen der EZM [221].

Auch der Einfluss von Plasminogenaktivatoren und deren Rezeptoren wurde in mehreren Studien untersucht. So konnte gezeigt werden, dass tPA einen direkten, nicht plasminabhängigen Einfluss auf die Leukozytenrekrutierung im IRS der Lunge und Niere hat [222, 223]. Unsere Arbeitsgruppe konnte in *in-vivo*-Versuchen am postischämischen Kremastermuskel die zugrundeliegenden Mechanismen weiter aufschlüsseln. So fanden wir heraus das tPA die Transmigration von neutrophilen Granulozyten nach I/R durch proteolytische Aktivierung von Plasmin und anderen Proteasen fördert. Durch die gesteigerte Gefäßpermeabilität nach perivaskulär transmigriertes tPA, verstärkte wiederum die postischämische Leukozytenrekrutierung durch nicht-proteolytische Aktivierung von Mastzellen und Induktion der Lipidmediatoren-Synthese [224]. Des Weiteren konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass uPA über CD11b/Mac-1-Interaktion einen entscheidenden Einfluss auf die postischämische Leukozytenrekrutierung durch gesteigerte intravaskuläre Adhärenz und Erleichterung der parazellulären Transmigration hat. Die pharmakologische Blockade von uPA verminderte die Leukozytenrekrutierung nach I/R der Leber und schwächte Gewebeschäden wirksam ab [225].

Ferner konnten Studien einen Einfluss von PAI-1 auf den IRS nachweisen. PAI-1 hat durch Einfluss auf die mikrovaskuläre Permeabilität und den postischämischen Umbau (*Remodeling*) einen kardioprotektiven Effekt beim

## Einleitung

Myokardinfarkt im Mausmodell gezeigt [226-228]. Beim ischämischen Schlaganfall führte die Inhibition von PAI-1 in Mäusen zu einem reduzierten Hirngewebeschaden, insbesondere bei einer Koinhibition von TAFI [229, 230]. PAI-1-defiziente Mäuse zeigten außerdem einen reduzierten Gewebeschaden nach I/R der Lunge, gleichzeitig war in einem anderen Modell eine gesteigerter PAI-1-Expression nach I/R der Lunge mit einem ausgedehnteren Gewebeschaden assoziiert [231, 232]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht ausreichend geklärt.

## **II Zielsetzung der Arbeit**

Folgende Ziele wurden für diese Arbeit definiert:

- 1) Die Rolle von PAI-1 auf die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung in das perivaskuläre Gewebe nach I/R analysieren und die zugrunde liegenden Mechanismen aufschlüsseln.
- 2) Den Einfluss von PAI-1 auf die mikrovaskuläre Hämostase untersuchen, um daraus Rückschlüsse auf mögliche Nebenwirkungen einer PAI-1-Hemmung ziehen.



### **III Material und Methoden**

#### **1 Genehmigung und Vorbemerkung**

Alle Tierexperimente sind in der Zeit von Januar 2012 bis Dezember 2017 am Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München unter den Tierversuchsanträgen AZ 55.2-1-54-2531.84/09 und 55.2-1-54-2532-115-12 gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz mit der Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt worden.

#### **2 Versuchstiere**

Zur Durchführung der Experimente wurden Wildtyp (WT) C57BL/6J Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) und PAI-1-defiziente (PAI-1<sup>-/-</sup>) Mäuse mit genetischem C57BL/6J Hintergrund (*The Jackson Laboratory*, Bar Harbor, Maine, USA) verwendet [233]. Alle Versuchstiere waren männlich, im Alter von 10–12 Wochen, mit einem Körpergewicht von 20 bis 30g. Die Tiere wurden unter standardisierten Laborbedingungen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser im Tierstall des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin gehalten.

#### **3 Narkose**

Die Mäuse wurden unter Verwendung eines Ketamin (100 mg/kg)/Xylazin (10 mg/kg)-Gemisches in Verdünnung mit Natriumchlorid 0,9% (Verhältnis: 2,5 : 0,5 : 7) betäubt, welches durch intraperitoneale Injektion verabreicht wurde. Die Narkose wurde durch wiederholte Injektionen bis zur Beendigung des Versuchs aufrechterhalten. Die Körpertemperatur der Versuchstiere wurde während der Präparation und Intravitalmikroskopie mithilfe von Wärmeplatten und Wärmestrahlern konstant gehalten. Für intraskrotale oder intravenöse Injektionen über die Kaudalvene wurde eine kurz anhaltende Gasnarkose mit Isofluran (Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und N<sub>2</sub>O mit Sauerstoff (FiO<sub>2</sub> 0,35) eingesetzt.

## **4     *In-vivo*-Modelle**

### **4.1    Chirurgische Verfahren und Injektionstechniken**

#### **4.1.1 Kaudalveneninjektion**

Die Kaudalvenen am Schwanz der Maus eignen sich zur intravenösen Verabreichung von Antikörpern oder Inhibitoren. Nach Einleitung einer Kurznarkose mit Gas wurde die Maus fixiert und die Venen durch Kompression gestaut. Nach Desinfektion folgte die Kanülierung mit einer 30G Nadel und die Injektion der zu applizierenden Substanzen über einen konnektierten Polypropylenkatheter. Im Anschluss wurde die Nadel entfernt und ein mögliches Nachbluten mittels Komresse verhindert.

#### **4.1.2 Katheterisierung der *Arteria femoralis***

Ein intraarterieller Zugang durch retrograde Kanülierung der *A. femoralis* eignete sich während der durchgeführten Experimente zur Verabreichung von Reagenzien, wie beispielsweise Antikörpern oder Mikrosphären. Die chirurgische Präparation wurde unter Verwendung eines Lichtmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland) mit 16-facher Vergrößerung durchgeführt. Nach intraperitonealer Narkoseeinleitung wurde die Maus auf dem Rücken fixiert und die Haut der linken Leistenregion eröffnet. Die Faszien der Gefäß-Nerven-Scheide wurden mittels stumpfer Präparation voneinander getrennt und die *A. femoralis* retrograd mit einem Polypropylenkatheter (Innendurchmesse 0,28 mm, Portex, Lythe, Großbritannien) kanüliert. Anschließend wurde der Katheter mittels Ligaturen fixiert und der Hautschnitt mit Einzelknopfnähten verschlossen.

### 4.1.3 Präparation des *Musculus cremaster*

Durch die chirurgische Präparation des Kremastermuskels hat man die Möglichkeit einen Einblick in die Mikrozirkulation eines lebenden Organismus zu erlangen. Sie wurde unter Verwendung eines Lichtmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland), wie ursprünglich von Baez beschrieben, mit geringfügigen Modifikationen durchgeführt [234, 235]. Nach Narkotisierung und Fixierung des Versuchstiers wurde der rechte Kremastermuskel durch eine ventrale Inzision des Hodensacks freigelegt. Daraufhin wurde der Muskel in einer relativ avaskulären Zone ventral eröffnet und auf einen transparenten Sockel aufgespannt. Nebenhoden und Hoden wurden vom Kremastermuskel gelöst und in die Bauchhöhle zurück verlagert. Sorgfältige Elektrokauterisation wurde zur Blutstillung angewendet. Während des gesamten Verfahrens und während der darauffolgenden *in-vivo*-Mikroskopie wurde der Muskel mit warmer, gepufferter Kochsalzlösung umspült.

### 4.1.4 Stimulation des *Musculus cremaster* durch intraskrotale Injektion

Eine vorangehende intraskrotale Injektion diente der Stimulation von lokalen Prozessen, die nach Präparation des Kremastermuskels *in vivo* untersucht werden konnten. Nach einer Kurznarkose mit Gas wurde die entsprechend dem Versuchsprotokoll zu applizierende Substanz (Vgl. Kap. III/6.2) mit einer 30G Kanüle in das Skrotum injiziert. Das maximal injizierte Volumen betrug dabei 400µl.

### 4.1.5 I/R des *Musculus cremaster*

Für die Analyse der Auswirkungen einer temporären Ischämie und anschließender Reperfusion auf die Mikrozirkulation, wurde der präparierte Kremastermuskel (Vgl. Kap. III/4.1.3) mit einer Gefäßklemme (Martin, Tuttlingen, Deutschland) an seiner Basis abgeklemmt. Die Stagnation des Blutflusses der zu- und abführenden Gefäße wurde durch *in-vivo*-Mikroskopie verifiziert. Nach

30 Minuten Ischämie wurde die Gefäßklemme entfernt und die Reperfusion für eine, je nach angewandtem Versuchsprotokoll definierte Zeit wiederhergestellt (Vgl. Kap. III/6). Untersuchungszeitpunkte und -modalitäten richteten sich ebenfalls nach dem jeweiligen Versuchsprotokoll. Für scheinoperierte Kontrolltiere wurde dasselbe chirurgische Protokoll benutzt, die Gefäßklemme an der Basis des Kremastermuskels jedoch nur für ein paar Sekunden angesetzt und geschlossen.

### **4.1.6 Warme I/R der Leber**

Nach Narkotisierung der Tiere und zusätzlicher intraperitonealer Opioidapplikation, wurde die Bauchhöhle durch eine mediane Laparotomie eröffnet. Eine warme Ischämie des linken Leberlappens wurde für 90 Minuten durch reversibles Festklemmen der Versorgungsgefäße mit einer Gefäßklemme (Martin, Tuttlingen, Deutschland) induziert [236]. Nach 120 Minuten Reperfusion wurden am Ende des Experiments Blut- und Gewebeproben entnommen. Die Blutproben wurden unmittelbar 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert und bei -80 °C gelagert. Die Serumaktivitäten der Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransaminase (ALT) wurden maschinell (Hitachi 917; Roche-Boehringer Mannheim, Co, Deutschland) unter Verwendung standardisierter Testsysteme (HiCo GOT und HiCo GPT; Roche-Boehringer Mannheim, Co) gemessen. Der linke Leberlappen wurde zur weiteren Analyse für immunhistochemische Färbungen fixiert und in Paraffin eingebettet.

### **4.1.7 Gewinnung und Transfer von Knochenmarksleukozyten**

Um zwischen dem Beitrag von leukozytärem und nicht-leukozytärem PAI-1 an der postischämischen Leukozytenrekretierung zu differenzieren, wurde eine etablierte Zelltransfertechnik eingesetzt [237]. Leukozyten wurden aus getöteten Spendermäusen isoliert, indem die Oberschenkel- und Schienbeinknochen mit PBS (*phosphate buffered saline*) gespült wurden. Die dadurch aus dem Knochenmark gewonnenen Zellen (> 90% neutrophile Granulozyten) wurden

gesiebt (Cell Strainer, 70 µm Porengröße, White; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) und gezählt (Coulter AC-T-Serie; Coulter Corporation, Miami, FL, USA), in PBS resuspendiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM (10 µmol/L Endkonzentration) bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 120 Minuten vor Operationsbeginn (Vgl. Kap. III/4.1.3) intravenös über die Kaudalvene (10<sup>7</sup> Zellen/Maus) in die Empfängermäuse injiziert und anschließend quantifiziert (Vgl. IV/4.2.2).

### **4.1.8 Depletion von neutrophilen Granulozyten**

Die Depletion von neutrophilen Granulozyten wurde mit einem monoklonalen Anti-Maus-AK erreicht (monoklonaler Anti-Ly6G-Antikörper; Klon 1A8; 100 µg, BD Biosciences), welcher 24 und 6 Stunden vor dem Beginn eines Experiments mittels Kaudalveneninjektion verabreicht wurde. Die erfolgreiche Neutrophilendepletion wurde mittels Differentialblutbild an einem Hämatologie-Analysegerät (ProCyte Dx cell counter; IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) bestätigt und als eine Reduktion der zirkulierenden Neutrophilen um mehr als 95% im Vergleich zu den mit einem Isotyp-Kontrollantikörper behandelten Tieren definiert.

### **4.1.9 Blutentnahme und Tötung der Tiere**

Am Ende von jedem Tierversuch wurde eine Blutentnahme durch direkte Herzpunktion durchgeführt. Hierfür wurde eine mediane Inzision der Haut im Bereich des Oberbauchs am narkotisierten Tier vorgenommen und das Herz transdiaphragmal mit einer 20G-Kanüle punktiert. Das Blut wurde in eine mit Heparin (10 µl; Heparin-Natrium-25000-ratiopharm; Ratiopharm, Ulm, Deutschland) präparierte Spritze aufgenommen und für weitere Messungen verwendet. Die Tiere wurden im Anschluss durch Ausbluten und zervikale Dislokation getötet.

### 4.2 Intravitalmikroskopie (IVM)

Zur intravitalem Visualisierung der Mikrozirkulation mit Durchführung unterschiedlicher Analysen, wurde eine Kombination von Transilluminations- und Fluoreszenzmikroskopie benutzt. Zur Untersuchung der Leukozytenrekrutierung und der mikrovaskulären Permeabilität wurde ein Axiotech Vario 100 Mikroskop (Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) verwendet, welches sich neben der Fluoreszenzmikroskopie auch für die *reflected light oblique transillumination* (RLOT)-Mikroskopie (siehe unten) eignet [238]. Zusätzlich war es mit einer Colibiri LED-Lichtquelle (Zeiss MicroImaging GmbH) für die Fluoreszenz-Epiilluminationsmikroskopie ausgestattet. Das Licht wurde über einen Filtersatz 62HE (Zeiss MicroImaging GmbH), welcher mit dichroitischen und Emissionsfiltern (TFT 495+610 [HE]; abstimmbarer Bandpass 527+LP615 [HE]) ausgestattet war, auf das Objekt gelenkt. Die Mikroskopiebilder und -videoclips wurden mit einer AxioCam Hsm-Digitalkamera unter Verwendung eines Wasserimmersionsobjektivs mit 20-facher Vergrößerung (0,5 numerische Apertur [NA]; Zeiss MicroImaging GmbH) aufgenommen.

Die RLOT-Mikroskopie wurde durch die Positionierung eines schräg eingebrachten spiegelnden Reflektors direkt unter dem Objekt erreicht. Der Reflektor bestand aus einem runden Deckglas (Dicke 0,19-0,22 mm; Durchmesser 11,8 mm), das mit Aluminiumdampf (Freichel, Kaufbeuren, Deutschland) beschichtet und in direkten Kontakt mit dem darüber liegenden Objekt gebracht wurde. Dadurch entsteht ein relativ hoher Bildkontrast, welcher beispielsweise die Darstellung von intravaskulären und in das umgebende Gewebe transmigrierten Leukozyten ohne den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen erlaubt.

Für die intravitale Analyse von photochemisch induzierten mikrovaskulären Thrombosen und zur Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeit wurde ein Mikroskop Olympus BX 50 (Olympus Mikroskopie, Hamburg, Deutschland) verwendet. Das Licht einer 75 Watt Xenon Quelle wurde von einem galvanometrischen Scanner (Polychrome II; TILL Photonics, Gräfelfing, Deutschland) auf einen nahezu monochromatischen Strahl mit einer Wellenlänge

von 488 nm gebündelt und über einen Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Filterwürfel, der mit dichroitischen und Emissionsfiltern ausgestattet ist (DCLP 500, LP515; Olympus-Mikroskopie), auf das Objekt geleitet. Die mikroskopischen Bilder wurden mit Olympus-Wasserimmersionsobjektiven (20x NA 0,5 und 60x NA 0,9) gewonnen, mit einer ladungsgekoppelten Gerätekamera (IMAGO S/N 382KLO345; TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland) aufgenommen und einer digitalen Bildanalyse (TILLvisION 4.0; TILL Photonics GmbH) unterzogen.

### **4.2.1 Quantifizierung der Leukozytenmigration und hämodynamischer Parameter**

Die Analyse der Parameter, welche die aufeinanderfolgenden Schritte der Leukozytenextravasation beschreiben, wurde mit der Software AxioVision 4.6 (Zeiss MicroImaging GmbH) durchgeführt. Für die weitere Bildverarbeitung und -analyse wurde die Software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) verwendet. Zur Messung der mittleren Blutflussgeschwindigkeit wurden grün fluoreszierende Mikrosphären (0,96  $\mu\text{m}$  Durchmesser; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) über den Femoralarterienkatheter injiziert, und ihr Durchgang durch die Zielgefäße unter stroboskopischer Beleuchtung (Belichtung, 1 ms; Zykluszeit, 10 ms;  $\lambda=488$  nm) aufgezeichnet. Zur Bestimmung der mittleren Blutflussgeschwindigkeit wurden pro Zielgefäß drei Mikrosphären verwendet, welche frei in der Gefäßmitte flossen. Die Distanz zwischen einer individuellen Mikrosphäre in zwei aufeinander folgenden Bildern wurde gemessen, woraufhin die Geschwindigkeit aus dem zeitlichen Abstand der Bildaufnahmen errechnet werden konnte. Aus der mittleren Blutflussgeschwindigkeit und den ausgemessenen Gefäßdurchmessern wurde die scheinbare Wandschubspannung berechnet, wobei ein parabolisches Fließgeschwindigkeitsprofil über den Gefäßquerschnitt angenommen wurde. Rollende Leukozyten wurden als solche definiert, die sich langsamer als der zugehörige Blutfluss bewegten und für 30 Sekunden lang quantifiziert. Als adhärente Zellen wurden solche gewertet, die länger als 30 Sekunden im Blutfluss eines 100  $\mu\text{m}$  messenden Gefäßabschnitts statisch ruhten und mit dem luminalseitigen Gefäßendothel in

Beziehung standen. Transmigrierte Zellen wurden in einer ROI (*region of interest*) gezählt, welche 75 µm auf beiden Seiten eines Gefäßes über 100 µm Gefäßlänge umfasste. Für alle Parameter wurden Mittelwerte aus Messungen von 3-5 postkapillären Venolen pro Versuchstier ermittelt.

### **4.2.2 Quantifizierung der Rekrutierung von fluoreszenzmarkierten Leukozyten nach Zelltransfer**

Um zwischen dem Beitrag von leukozytärem und nicht-leukozytärem PAI-1 an der postischämischen Leukozytenrekrutierung zu differenzieren, wurde wie oben beschrieben eine Zelltransfertechnik eingesetzt (Vgl. IV/4.1.7). Die transfundierten fluoreszierenden Zellen wurden in 175 Gesichtsfeldern pro Kremastermuskel gezählt; dies entspricht der gesamten quantifizierbaren Fläche eines externalisierten Kremastermuskels. Die Ergebnisse wurden als Anzahl der adhären oder transmigrierten Calcein-markierten Zellen pro Gesichtsfeld dargestellt.

### **4.2.3 Photochemisch-induzierte mikrovaskuläre Thrombusbildung**

Um die mikrovaskuläre Thrombusbildung zu untersuchen wurde eine photochemische Endothelzellschädigung in den Arteriolen und Venolen des Kremastermuskels ausgelöst. Nach der chirurgischen Präparation des Kremastermuskels wurden geeignete Gefäße ausgewählt, die mittlere Blutflussgeschwindigkeit bestimmt (Vgl. Kap. III/4.2.1) und anschließend FITC-Dextran (150 kDa, 2,5%, 6 ml/kg Körpergewicht, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) über den Femoralarterienkatheter appliziert. Die Fotoaktivierung wurde daraufhin durch die Exposition eines Gefäßsegments von 300 µm Länge mit kontinuierlichem Auflicht mit einer Wellenlänge von 488 nm unter Verwendung einer Olympus-Wasserimmersionslinse (×60/NA 0,9) eingeleitet. Eine durch Sauerstoffradikale bedingte Gefäßendothelschädigung führte schließlich zu einer lokalisierten Thrombusbildung. Die Thrombusbildung wurde in mehreren Venolen



(40-55  $\mu\text{m}$  Durchmesser) und Arteriolen (30-40  $\mu\text{m}$  Durchmesser) visualisiert und quantitativ analysiert. Der Beginn der Thrombusbildung („Beginn“) wurde durch den Zeitpunkt definiert, an welchem sich die ersten Thrombozyten an der Gefäßwand anlagern. Als Zeit bis zum vollständigen Verschluss des Gefäßes („Verschluss“) wurde der Moment des vollständigen Stillstandes des Blutflusses für mindestens 60 Sekunden definiert. Der Grenzwert für die Dauer der Messungen bis zum vollständigen Gefäßverschluss wurde für Venolen mit 20 Minuten und für Arteriolen mit 40 Minuten festgelegt.

### **4.2.4 Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität**

Als Maß für die mikrovaskuläre Permeabilität wurde die Extravasation des Makromoleküls FITC-Dextran (5 mg in 0,15 ml Kochsalzlösung, relative Molekularmasse 150 kDa) im Kremastermuskel analysiert. 30 Minuten nach intraarterieller Applikation von FITC-Dextran wurden 6 zufällig ausgewählte postkapilläre Venolen mit 20-30  $\mu\text{m}$  Durchmesser und das umgebende perivaskuläre Gewebe bei 488 nm angeregt und die Emission 515 nm mit einer AxioCam Hsm-Digitalkamera (Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland) unter Verwendung eines geeigneten Emissionsfilters (LP 515) aufgezeichnet. Die mittleren Grauwerte der Fluoreszenzintensität wurden mittels digitaler Bildanalyse (ImageJ Software; National Institutes of Health) in 6 zufällig ausgewählten 50×50  $\mu\text{m}$  großen Bereichen gemessen, die 50  $\mu\text{m}$  von der zu untersuchenden postkapillaren Venole entfernt waren. Der gemessene Mittelwert wurde als Maß für die Extravasation von FITC-Dextran und damit der mikrovaskulären Permeabilität verwendet.

### **4.2.5 Mikrovaskuläre Fibrin(ogen) Ablagerung**

Um mögliche Nebeneffekte unserer Experimente auf das fibrinolytische System in der Mikrozirkulation einschätzen zu können, wurde die Ablagerung von Fibrin(ogen) auf mikrovaskulären Endothelzellen durch *in-vivo*-

Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Alexa 488-konjugiertes menschliches Fibrinogen (17 mg/kg; Molecular Probes, Eugene, OR) wurde 5 Minuten nach Ischämieinduktion intraarteriell verabreicht (Vgl. Kap. III/4.1.5 und IV/4.1.6). Zur Beurteilung der mikrovaskulären Verteilung von Fibrin(ogen) wurden 3 bis 5 postkapillare Venolen im Kremastermuskel oder 5 Gesichtsfelder in den Lebersinusoiden bei WT- und PAI-1<sup>-/-</sup>-Tieren, die sich einer I/R-Untersuchung unterzogen, randomisiert analysiert (30- bzw. 90-minütige Ischämie und 120-minütige Reperfusion; n=3 pro Gruppe). Die Ablagerung von Alexa 488-konjugiertem Fibrin(ogen) wurde durch die Messung von Fluoreszenzintensitäten mit der Software Image J (National Institutes of Health) analysiert.

## **5 Ex-vivo- und in-vitro-Experimente**

### **5.1 Konfokalmikroskopie**

Für die Analyse der Proteinexpression im Gewebe wurde der Kremastermuskel mithilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Dazu wurde der in 4 % Paraformaldehyd fixierte Kremastermuskel mit einer Lösung aus 10 % Ziegsenrum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0,5 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) und PBS geblockt und permeabilisiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit primären Antikörpern gegen verschiedene Zielstrukturen für 12 Stunden bei 4 °C: Anti-Ly6G-AK (Invitrogen, Carlsbad, CA) zur Identifizierung von neutrophilen Granulozyten, einem monoklonalen Alexa-Fluor-647-anti-CD31/PECAM-1-AK (Invitrogen) zur Darstellung der venulären Endothelzellen und einem Kaninchen Anti-Maus-anti-PAI-1-AK (Abcam, Cambridge, UK) zur Visualisierung der PAI-1-Verteilung. Danach wurde das Gewebe mit den sekundären Alexa-Fluor-488-verknüpften Ziegen-anti-Ratten- oder Alexa-Fluor-546-verknüpften Ziegen-anti-Kaninchen-AK (Invitrogen) für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der immungefärbte Kremastermuskel wurde daraufhin in Permafluor (Beckman Coulter, Fullerton, CA) auf einen Objektträger befestigt und mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Leica SP5, Leica

Microsystems, Wetzlar, Deutschland) mit einer Öl-Immersions-Linse (40x, NA 1,4; Leica) beobachtet.

### 5.2 Immunhistochemie

Zur Bestimmung des Phänotyps transmigrierter Leukozyten, wurde eine Immunfärbung von paraffineingebetteten seriellen Gewebeschnitten des Kremastermuskels oder der Leber durchgeführt. Die Schnitte wurden mit primären Ratte-anti-Maus-anti-Ly6G-AK, Anti-CD45-AK (BD Biosciences), Anti-F4/80-AK (Serotec, Oxford, UK) IgG oder Isotyp-Kontrollantikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Paraffinschnitte mit kommerziell erhältlichen Immunhistochemie-Kits (Ly6G, CD45, Super Sensitive Link-Label ICH detection system; BioGenex, San Ramon, CA; F4/80, Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) gefärbt. Schließlich wurden die Schnitte mit Hämalanlösung nach Mayer gegengefärbt. Die Anzahl extravasal lokalisierter Ly6G-, CD45- oder F4/80-positiver Zellen wurde durch Lichtmikroskopie (Vergrößerung 400x) auf 3 Schnitten (10 Gesichtsfelder pro Schnitt) von 6 unterschiedlichen Tieren pro Versuchsgruppe verblindet quantifiziert. Die Anzahl der transmigrierten Ly6G-positiven Zellen (neutrophile Granulozyten) und F4/80-positiven Zellen (Monozyten/Makrophagen) wurde als Prozentsatz der gesamten CD45-positiven Leukozyten dargestellt.

In Paraffin eingebettete Leberabschnitte wurden zusätzlich mit der *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-digoxenin nick-end labeling* (TUNEL)-Methode, die der Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen dient, durch ein kommerziell erhältliches Kit (Roche-Boehringer Mannheim, Co, Deutschland) angefärbt [239, 240]. TUNEL-positive Zellen wurden verblindet mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Vergrößerung 400x) in 10 Gesichtsfeldern gezählt.

### **5.3 Bestimmung der makromolekularen Permeabilität von Endothelzellschichten**

Humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC; CDC/EU.HMEC-1; DCD, Atlanta, GA, USA) wurden in endothelialelem Wachstumsmedium (ECGM; Provitro, Berlin, Deutschland) mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (Biochrom, Berlin, Deutschland), Penicillin (100 U/mL)/Streptomycin (100 µg/mL) und Amphotericin B (0,25 µg/mL) bei 37 °C in befeuchteter Luft (5 % CO<sub>2</sub>) auf Transwell-Zellkulturplatteneinsätzen (Porengröße 0,4 µm, Corning, New York, USA) kultiviert. Die Zellen wurden entweder nicht (Kontrollen) oder mit unterschiedlichen Konzentrationen von humanem PAI-1 behandelt. In zusätzlichen Experimenten wurden die Zellen für 15 Minuten mit rezeptor-assoziiertem Protein (RAP; 100 g/ml) vorbehandelt, bevor PAI-1 (100ng/ml) hinzugegeben wurde.

Daraufhin wurde dem oberen Kompartiment FITC-Dextran (40 kDa; 1 mg/mL; Sigma-Aldrich) bei t=0 Minuten zugegeben. Die Proben wurden aus dem unteren Bereich bei t=60 Minuten entnommen. Der Fluoreszenzanstieg (Exzitationswellenlänge: 485 nm; Emissionswellenlänge: 535 nm) der Proben wurde mit einem Fluoreszenz-Mikroplattenlesegerät (SpectraFluor Plus, Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen und ausgewertet.

Diese Experimente wurden in Kooperation von der Arbeitsgruppe Professor Stefan Zahler (Department Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München, München/Deutschland) durchgeführt.

### **5.4 Durchflusszytometrie**

Zur quantitativen Erhebung der Expression von Oberflächenproteinen auf neutrophilen Granulozyten, wurde eine durchflusszytometrische Analyse von antikoagulierten Vollblutproben von WT-Mäusen durchgeführt. Nach Blutentnahme durch Herzpunktion (Vgl. Kap. III/4.1.9), wurden die Proben in Hank's ausgewogener Salzlösung (Life Technologies, Carlsbad, CA) und mit

verschiedenen Konzentrationen (1-100 ng/mL) von PAI-1 oder Phorbol Myristat Acetat (1 ng/mL), als Positivkontrolle, sowie PBS als Negativkontrolle in Gegenwart von ICAM-1/Fc (10 µg/mL; R&D Systems), VCAM-1/Fc (Fc; 10 µg/mL; R&D Systems) und Phycoerythrin-konjugiertem antihumanen IgG1 (Fc-spezifisch; Southern Biotechnology) 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. In weiteren Experimenten wurden die Zellen mit RAP oder Vehikel, Anti-LRP-1-AK oder Isotyp-Kontrollantikörper SB203580 (25 µmol/L; Sigma Aldrich), SP600125 (5 µmol/L; Sigma Aldrich), FR180204 (15 µmol/L; Sigma Aldrich) oder Vehikel behandelt. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD45, CD11b, CD115 und Gr1 markiert. Die Expression von ICAM-1/CD54 oder VCAM-1/CD106 wurde mit einem Durchflusszytometer (Gallios, Beckmann Coulter) gemessen. In getrennten Experimenten wurde die Expression von PAI-1 und des PAI-1-Rezeptors LRP-1 (*low density lipoprotein receptor-related protein 1*) in neutrophilen Granulozyten, die aus dem peripheren Blut von Wildtypmäusen isoliert wurden, oder in HMECS unter Verwendung von anti-PAI-1-AK oder LRP-1-AK analysiert. Die Ergebnisse wurden mit der FlowJo-Software (Treestar) analysiert.

### 5.5 Systemische Leukozytenzahl und Differentialblutbild

Nach der *in-vivo*-Mikroskopie wurde aus heparinisierten Vollblutproben (Vgl. Kap. III/4.1.9) die systemischen Leukozytenzahl mit einem Coulter-ACT-Zähler (Coulter, Corp, Miami, FL) bestimmt oder ein Differentialblutbild mittels einem Hämatologie-Analysegerät (ProCyt Dx cell counter; IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) erstellt.

### 5.6 Leberenzyme

Als Maß der Gewebeschädigung nach I/R-Versuchen der Leber (Vgl. Kap. III/4.1.6) wurden Transaminasen-Serumspiegel bestimmt. Die mittels Herzpunktion entnommenen Vollblutproben wurden sofort bei 2000g für 10

Minuten zentrifugiert und das überstehende Plasma bei -80°C gelagert. Die Aktivitäten der ALT und AST im Serum wurden bei 37 °C mit einem automatischen Analysator (Hitachi 917; Roche-Boehringer, Mannheim, Deutschland) unter Verwendung standardisierter Testsysteme (HiCo GOT und HiCo GPT; Roche-Boehringer) bestimmt.

### **5.7 Zellviabilität von Hepatozyten**

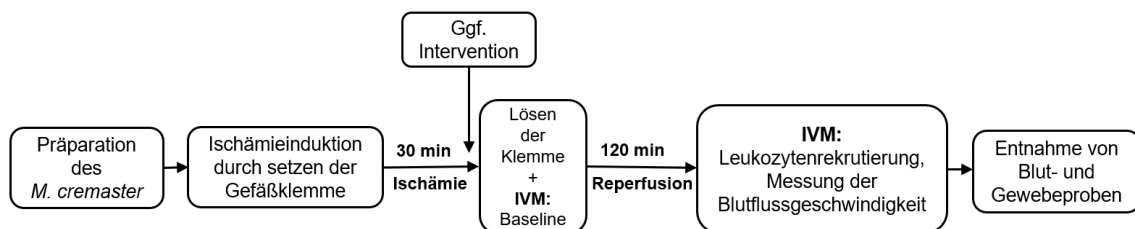
Mögliche direkte zytotoxische oder zytoprotektive Effekte von PAI-1 wurden durch Alamar-Blue-Reduktionsanalysen mit primär murinen Hepatozyten nachgewiesen [241]. Die Hepatozyten wurden aus Mäusen durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert und in gelatinebeschichtete Multiwell-Platten in William E Kompletmedium, ergänzt mit 50 ng/mL epidermalem Wachstumsfaktor, 1 µg/mL Insulin, 10 µg/mL Transferrin und 1,3 µg/mL Hydrocortison (alles von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), eingesät. Die Adhäsion wurde über Nacht zugelassen, und die Zellen 24 Stunden lang zwischen 0 und 1000 ng/mL PAI-1 ausgesetzt. 10 µmol/L Staurosporin (Sigma-Aldrich) dienten als positiver Kontroll-Todesreiz. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen gewaschen und das Reagenz Alamarblau hinzugefügt. Die metabolische Resazurin-Reduktion wurde 10 Stunden lang zugelassen, und die Resorufin-Fluoreszenz mit einem Synergy Mx-Mikroplatten-Lesegerät (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bestimmt. Die Fluoreszenzdaten wurden an unbehandelten Kontrollen kalibriert (100%ige Lebensfähigkeit).

## 6 Versuchsprotokolle

Zur Übersicht über die Versuchsdurchführungen dienen die Ablaufdiagramme, welche folgend in den **Abbildungen 3 bis 9** dargestellt werden.

### 6.1 I/R des Kremastermuskels

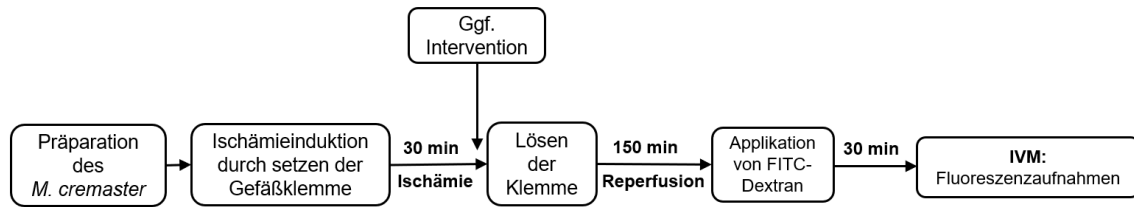
#### 6.1.1 Analyse der Leukozytenrekrutierung im Kremastermuskel nach I/R



**Abbildung 3:** Versuchsprotokoll zur Untersuchung der Leukozytenrekrutierung im Kremastermuskel nach I/R. IVM = *Intravitalmikroskopie*

Zur Untersuchung des Einflusses von I/R auf die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung wurde nach Einleitung der Narkose (Vgl. Kap. III/3), Femoraliskatheteranlage und Präparation des Kremastermuskels (Vgl. Kap. III/4.1.2/.3) eine 30-minütige Ischämie durch Setzen einer Gefäßklemme induziert. Die Reperfusionsphase nach Entfernung der Klemme betrug 120 Minuten. Je nach Versuchsgruppe wurden optional 5 Minuten vor der Klemmenentfernung zusätzlich entsprechende Reagenzien intraarteriell über den Femoraliskatheter verabreicht. Hämodynamische Parameter und die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung wurden gemäß den oben beschriebenen Methoden (Vgl. III/4.2.1) direkt nach Lösen der Klemme („Baseline“) und nach 120 Minuten Reperfusion in 3-5 postkapillären Venolen mittels IVM quantifiziert. Im Anschluss wurde die systemische Leukozytenzahl im Blut bestimmt und Gewebeproben entnommen.

### 6.1.2 Analyse der mikrovaskulären Permeabilität im Kremastermuskel nach I/R



**Abbildung 4:** Versuchsprotokoll zur Untersuchung der mikrovaskulären Permeabilität im Kremastermuskel nach I/R.

Zur Untersuchung des Einflusses von Ischämie und Reperfusion auf die mikrovaskuläre Permeabilität wurde, nach einer 30-minütigen Ischämie und 150 Minuten Reperfusion über den Femoraliskatheter das Makromolekül FITC-Dextran intraarteriell appliziert. Nach 30 weiteren Minuten wurde die mikrovaskuläre Permeabilität durch intravitalmikroskopische Fluoreszenzaufnahmen in 6 zufällig ausgewählten postkapillären Venolen gemessen (Vgl. III/4.2.4).

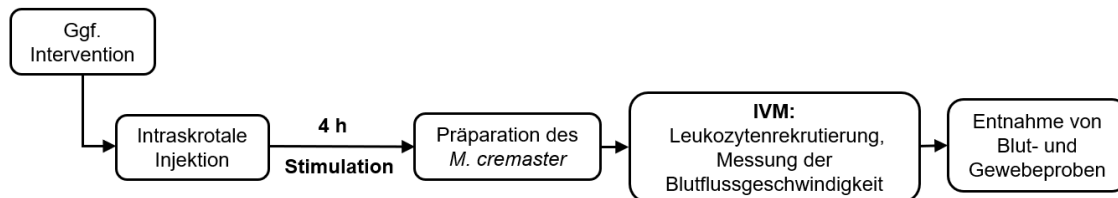
### 6.1.3 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden den folgenden Gruppen zugeordnet (n=4-6 pro Gruppe): Scheinoperierte WT-Mäuse, WT-Mäuse, PAI-1<sup>-/-</sup>-Mäuse und WT-Mäuse, welche 5 Minuten vor der Reperfusion mit Anti-LRP-1-AK, dem PAI-1-Inhibitor TM5275 (40 mg/kg Körpergewicht; intraarteriell) oder der Isotyp-Kontrollantikörper behandelt wurden.



## 6.2 Stimulation des Kremastermuskels durch intraskrotale Injektion

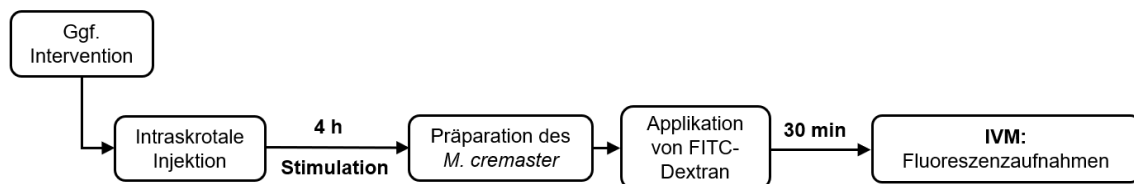
### 6.2.1 Analyse der Leukozytenrekrutierung im Kremastermuskel nach intraskrotaler Stimulation



**Abbildung 5:** Versuchsprotokoll zur Untersuchung der Leukozytenrekrutierung im Kremastermuskel nach intraskrotaler Stimulation.

Zur Untersuchung des Einflusses von lokal applizierten Substanzen auf die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung wurde dem Versuchstier 4 Stunden vor Beginn der Präparation während einer Kurznarkose (Vgl. Kap. III/3) der zu untersuchende Stimulus intraskrotal injiziert (Vgl. III/4.1.4). Entsprechend der jeweiligen Versuchsgruppe wurden optional Interventionen oder entsprechende Kontrollen vor der Injektion des Stimulus durchgeführt. Nach Femoraliskatheteranlage und Präparation des Kremastermuskels wurden hämodynamische Parameter und die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung in 3-5 postkapillären Venolen mittels IVM quantifiziert. Im Anschluss wurde die systemische Leukozytenzahl im Blut bestimmt und Gewebeproben entnommen.

### 6.2.2 Analyse der mikrovaskulären Permeabilität im Kremastermuskel nach intraskrotaler Stimulation



**Abbildung 6:** Versuchsprotokoll zur Untersuchung der mikrovaskulären Permeabilität im Kremastermuskel nach intraskrotaler Stimulation.

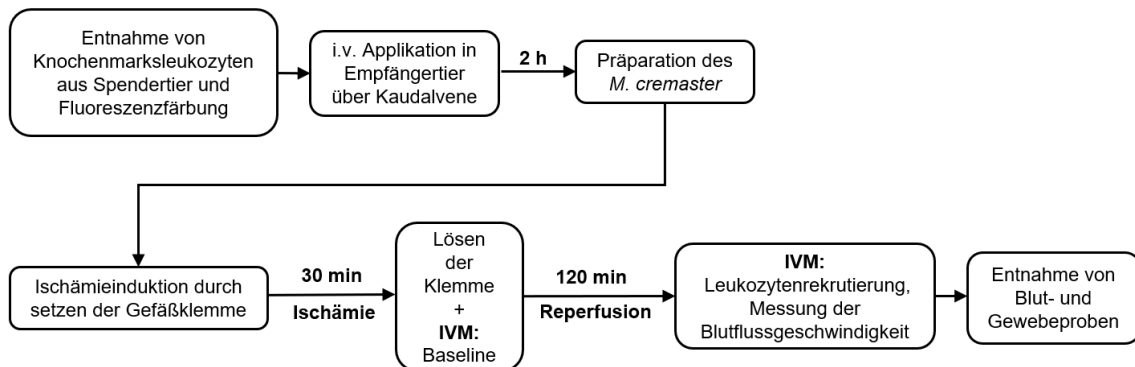
Zur Untersuchung des Einflusses von intraskrotal applizierten Substanzen auf die mikrovaskuläre Permeabilität wurde nach der Präparation des Kremastermuskels das Makromolekül FITC-Dextran intraarteriell appliziert. Nach 30 weiteren Minuten wurde die mikrovaskuläre Permeabilität durch intravitalmikroskopische Fluoreszenzaufnahmen in 6 zufällig ausgewählten postkapillären Venolen gemessen (Vgl. III/4.2.4).

### 6.2.3 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden den folgenden Gruppen zugeordnet (n=4 pro Gruppe): WT-Mäuse erhielten eine intraskrotale Injektion von PBS (200 µl; ergänzt mit 0,01 % BSA), verschiedene Dosen von murinem (aktivem) PAI-1 (0,01, 0,1, 1,0 µg; verdünnt in 200 µl PBS, ergänzt mit 0,01 % BSA), oder latentem (inaktivem) PAI-1 (1,0 µg; verdünnt in 200 µl PBS, ergänzt mit 0,01 % BSA). Zusätzliche Versuche (n=5 pro Gruppe) wurden an WT-Mäusen durchgeführt, die RAP, Anti-LRP-1-AK oder eine Vehikel-/Isotypkontrolle des Medikaments intravenös erhielten und mit rekombinantem murinem PAI-1 (1,0 µg intraskrotal) stimuliert wurden. Weitere Versuche (n=6 pro Gruppe) wurden an WT-Mäusen durchgeführt, die entweder mit dem Neutrophilendepletierenden monoklonalen Anti-Ly6G-AK 1A8 oder einer Isotypkontrolle vorbehandelt wurden (Vgl. Kap. III/4.1.8) und mit rekombinantem murinem PAI-1 (1,0 µg intraskrotal) stimuliert wurden.

### 6.3 Analyse der Rekrutierung von transfundierten fluoreszenzmarkierten Leukozyten im Kremastermuskel nach I/R

#### 6.3.1 Versuchsablauf



**Abbildung 7:** Versuchsprotokoll zur Untersuchung der Rekrutierung transfundierter fluoreszenzmarkierter Leukozyten nach I/R.

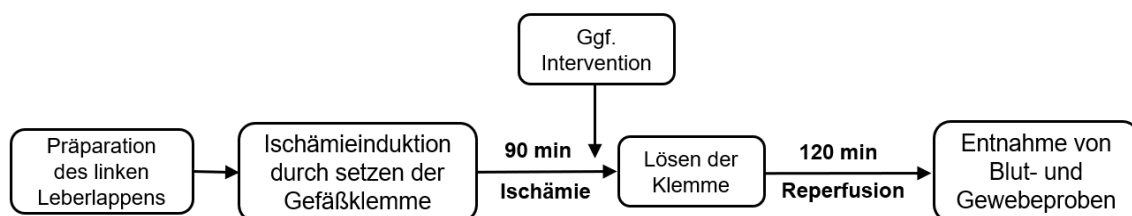
Um zwischen dem Einfluss von leukozytärem und nicht-leukozytärem PAI-1 auf die postischämische Leukozytenrekrutierung zu differenzieren, wurden dem Versuchstier (Empfängertier) 2 Stunden vor Präparation des Kremastermuskels die aus den getöteten Spendermäusen isolierten und fluoreszenzmarkierten Leukozyten (Vgl. Kap. III/4.1.7) intravenös über die Kaudalvene appliziert (Vgl. Kap. III/4.1.1). Nach Präparation wurde eine 30-minütige Ischämie mittels Gefäßklemme induziert. Die Reperfusionsphase nach Entfernung der Klemme betrug 120 Minuten. Die Analyse der Rekrutierung der transfundierten Leukozyten wurden direkt nach Lösen der Klemme („Baseline“) und nach 120 Minuten Reperfusion im gesamten Kremastermuskel mittels Intravitalmikroskopie durchgeführt (Vgl. III/4.2.2). Zusätzlich wurden hämodynamische Parameter erhoben (Vgl. III/4.2.1). Im Anschluss wurde die systemische Leukozytenzahl im Blut bestimmt und Gewebeproben entnommen.

### 6.3.2 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden den folgenden Gruppen zugeordnet (n=5 pro Gruppe): WT-Mäuse, welche fluoreszierende Leukozyten von WT- oder PAI-1<sup>-/-</sup>-Spendermäusen erhielten. PAI-1<sup>-/-</sup>-Mäuse, die fluoreszierende Leukozyten von WT-Spendermäusen erhielten.

## 6.4 I/R der Leber

### 6.4.1 Analyse des Gewebeschadens und der Leukozytenrekrutierung in der Leber nach I/R



**Abbildung 8:** Versuchsprotokoll zur Untersuchung des Gewebeschadens und der Leukozytenrekrutierung in der Leber nach I/R.

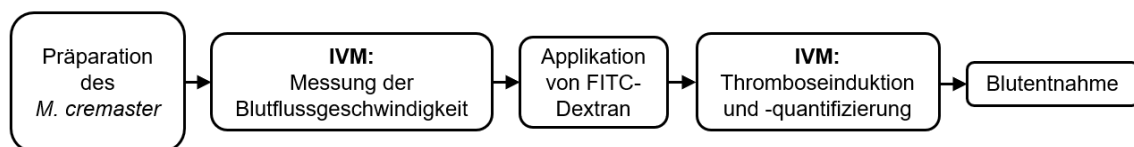
Um den Effekt von I/R auf die Leukozytenrekrutierung und den Gewebeschaden der Leber zu untersuchen, wurde nach Präparation der Leber (Vgl. III/4.1.6) eine 90-minütige Ischämie induziert. Die darauffolgende Reperusionsphase nach Entfernung der Klemme betrug 120 Minuten. Je nach Versuchsgruppe wurden optional 5 Minuten vor der Klemmenentfernung zusätzlich entsprechende Reagenzien intraarteriell über den Femoraliskatheter verabreicht. Am Ende der Reperusionszeit wurde die systemische Leukozytenzahl im Blut bestimmt und Gewebeproben entnommen.

### 6.4.2 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden den folgenden Gruppen zugeordnet (n=4-6 pro Gruppe): Scheinoperierte WT-Mäuse, WT-Mäuse, PAI-1<sup>-/-</sup>-Mäuse und WT-Mäuse, die mit dem PAI-1-Inhibitor TM5275 oder Vehikel behandelt wurden.

### 6.5 Quantifizierung der mikrovaskulären Thrombusbildung

#### 6.5.1 Versuchsablauf



**Abbildung 9:** Versuchsprotokoll zur Visualisierung und Quantifizierung der mikrovaskulären Thrombusbildung im Kremastermuskel.

Um den Einfluss von PAI-1 auf die mikrovaskuläre Thrombusbildung zu untersuchen wurde nach Präparation des Kremastermuskels das Makromolekül FITC-Dextran intraarteriell über den Femoraliskatheter appliziert. Die Thrombusbildung wurde daraufhin in 3-5 Venolen und 3 Arteriolen durch eine phototoxische Schädigung des Gefäßendothels ausgelöst, intravitalmikroskopisch visualisiert und die Zeiten bis zum Beginn der Thrombusbildung bzw. bis zum vollständigen Verschluss des Gefäßes erfasst (Vgl. III/4.2.3). Um die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen zu gewährleisten, wurden in allen Experimenten die mikrohämodynamischen Parameter, die Fluoreszenzintensität und die systemischen Leukozytenzahlen gemessen.

#### 6.5.2 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden den folgenden Gruppen zugeordnet (n=5 pro Gruppe): WT-Mäuse und PAI-1<sup>-/-</sup>-Mäuse.

## 7 Statistische Versuchsauswertung

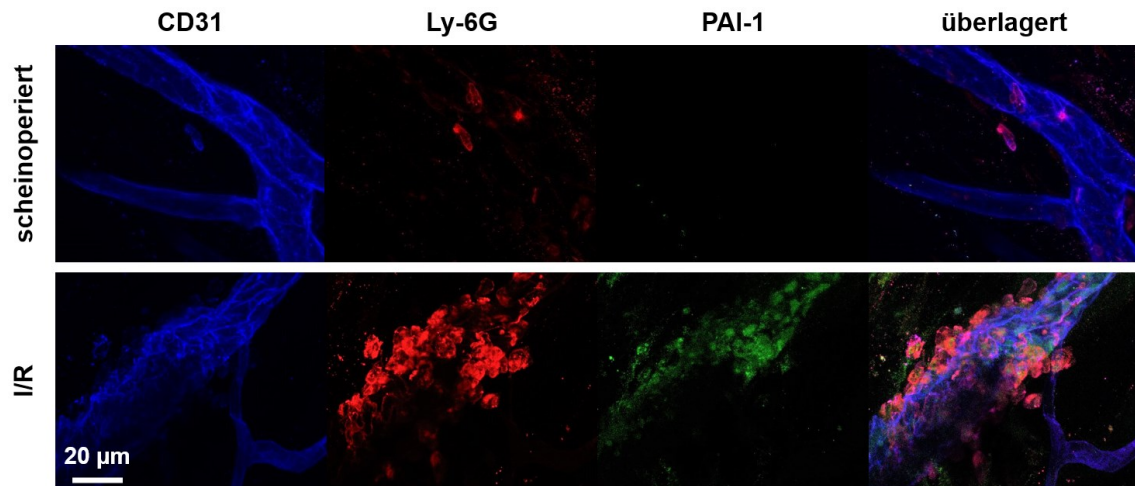
Alle Auswertungen der *in-vivo*-Experimente und Datenanalysen wurden verblindet durchgeführt. Zur Datenanalyse wurde ein statistisches Softwarepaket (SigmaStat für Windows; Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland) verwendet. Nach Testung der Daten auf Normalverteilung mittels dem Shapiro-Wilk-Test wurde die einfaktorielle Varianzanalyse, gefolgt vom Student-Newman-Keuls-Test (>2 Gruppen) oder dem t-Test (2 Gruppen) für die Schätzung der stochastischen Wahrscheinlichkeiten in Intergruppenvergleichen verwendet. Mittelwerte (MW, *mean*)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of mean*, SEM) wurden angegeben. P-Werte <0,05 wurden als signifikant angesehen.

## IV Ergebnisse

### 1 Rolle von PAI-1 für die postischämische Leukozytenrekrutierung

#### 1.1 Verteilung von PAI-1 im postischämischen Gewebe

Um die Rolle von PAI-1 in der Ischämie-Reperfusion zu verstehen, wurde zunächst dessen Verteilung im postischämischen Gewebe durch Immunfärbung des Kremastermuskels mithilfe der Konfokalmikroskopie dargestellt (**Abbildung 10**).



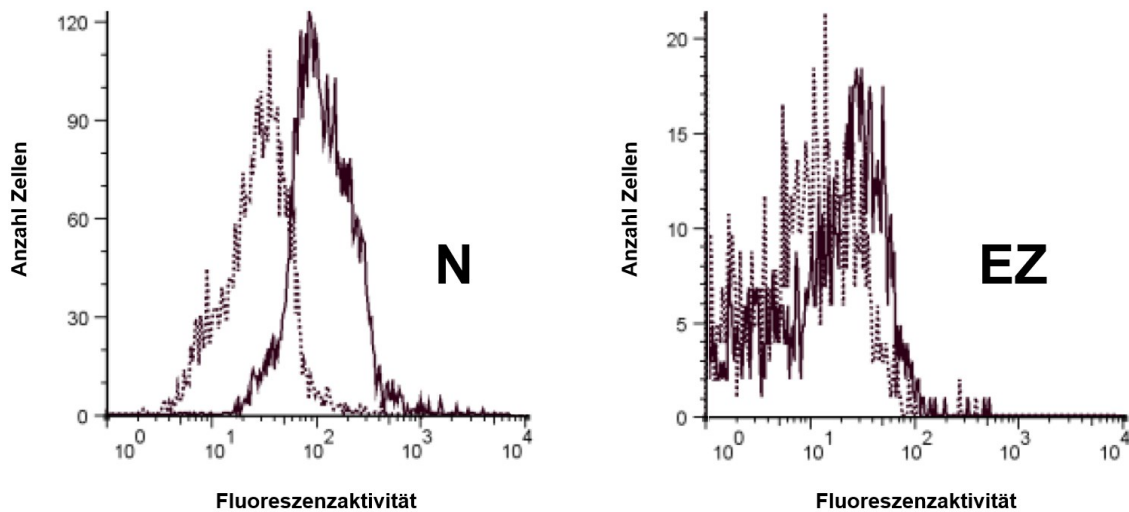
**Abbildung 10: Die Verteilung von PAI-1 im postischämischen Gewebe.** Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der Expression von PAI-1 (grün) auf neutrophilen Granulozyten (Ly6G; rot) und Endothelzellen in postkapillären Venolen (CD31; blau) des Kremastermuskels von scheinooperierten WT-Mäusen und von WT-Mäusen nach I/R (30/120 min).

Nach I/R konnte PAI-1 auf der Oberfläche von PECAM-1/CD31-positiven venulären Endothelzellen und auf Ly6G-positiven neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Außerdem fand sich in das perivaskuläre Gewebe extravasiertes PAI-1, während es in Venolen von scheinooperierten Tieren kaum nachgewiesen wurde.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen war in der Durchflusszytometrie die Expression von PAI-1 sowohl in neutrophilen Granulozyten, welche aus dem peripheren Blut von WT-Mäusen isoliert wurden, als auch in unstimulierten

## Ergebnisse

mikrovaskulären Endothelzellen gering. Nach Aktivierung mit TNF hingegen war die PAI-1-Expression in diesen Zellen signifikant erhöht (**Abbildung 11**). Darüber hinaus war die Expression des PAI-1-Rezeptors LRP-1 bei Stimulation mit TNF in Neutrophilen und Endothelzellen signifikant erhöht (Daten nicht gezeigt).

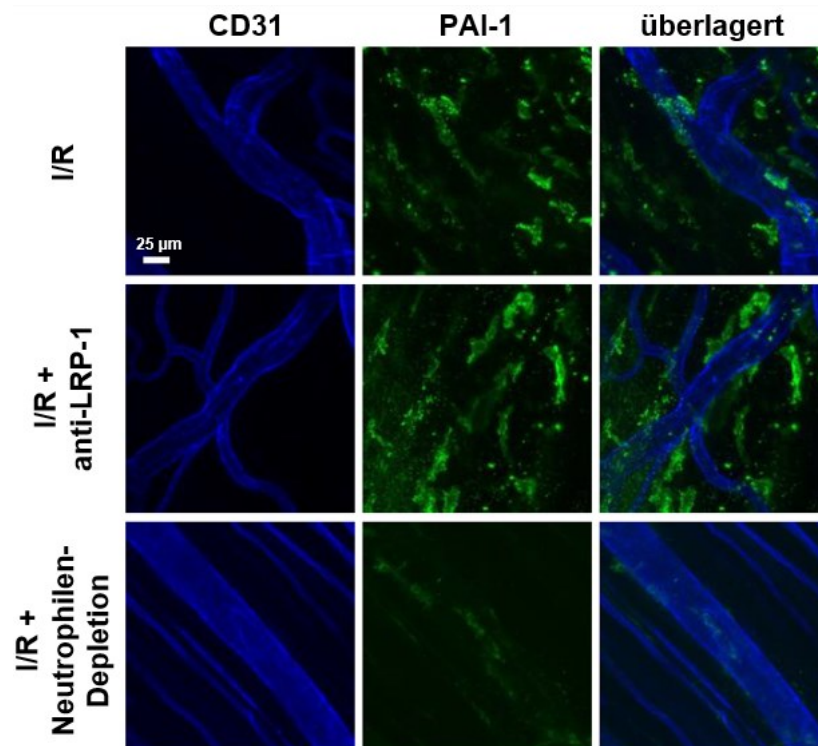


**Abbildung 11: Expression von PAI-1 auf neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen.** Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Expression von PAI-1 auf murinen neutrophilen Granulozyten (N) und Endothelzellen (EZ) analysiert, die einer Exposition mit PBS (Kontrolle, gestichelte Linien) oder TNF (durchgezogene Linien) ausgesetzt waren.



## Ergebnisse

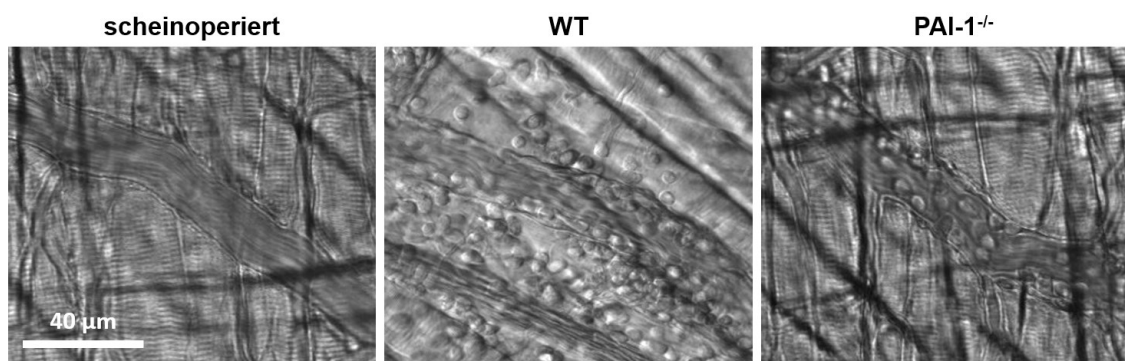
In weiteren konfokalmikroskopischen Aufnahmen des Kremastermuskels konnten wir jedoch keine Beeinträchtigung der mikrovaskulären PAI-1-Expression durch eine Depletion der neutrophilen Granulozyten oder eine Antikörperblockade seines Rezeptors LRP-1 nachweisen (**Abbildung 12**).



**Abbildung 12: Die Rolle von LRP-1 und neutrophilen Granulozyten bei der Ablagerung von PAI-1 auf mikrovaskulären Endothelzellen nach I/R.** Durch Verwendung von Immunfärbung und Konfokalmikroskopie wurde die Verteilung von PAI-1 *ex vivo* in den postkapillären Venolen des Kremastermuskels von WT-Mäusen nach I/R analysiert, die einen blockierenden Anti-LRP-1-AK, neutrophilendepletierende monoklonale Anti-Ly6G-AK oder Istoyp-Kontrollantikörper erhalten haben. Repräsentative Bilder von PECAM-1/CD31-positiven Zellen (Endothelzellen, Leukozyten; blau) und PAI-1 (grün).

## 1.2 Einfluss von PAI-1 auf Rollen, feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten

Da die Rekrutierung von Leukozyten in das postischämische Gewebe eine Schlüsselrolle im IRS übernimmt, wurde versucht die funktionelle Bedeutung von PAI-1 für die einzelnen Schritte des Extravasationsprozesses von Leukozyten im Kremastermuskel herauszuarbeiten (Vgl. III/4.2). Dazu wurden RLOT-Mikroskopieaufnahmen von postkapillären Venolen im Kremastermuskel von WT- und PAI-1<sup>-/-</sup>-Mäusen quantitativ ausgewertet (**Abbildung 13**).



**Abbildung 13: Schritte der Leukozytenextravasation.** Repräsentative *In-vivo*-Transilluminationsmikroskopie-Aufnahmen von intravaskulär adhärenenten und transmigrierten Leukozyten in postkapillären Venolen des Kremastermuskels bei scheinoperierten WT-Mäusen und bei WT- oder PAI-1-defizienten Mäusen nach I/R.

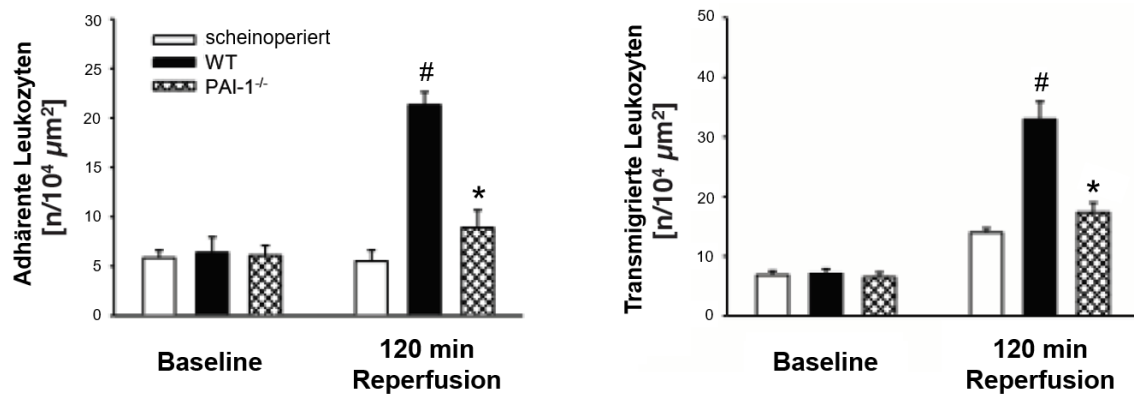
Nach 30 Minuten Ischämie und 120 Minuten Reperfusion zeigte sich kein signifikanter Anstieg der Anzahl von intravasal rollenden Leukozyten im Vergleich zu scheinoperierten Tieren. Auch in PAI-1-defizienten Mäusen war kein Unterschied im Leukozytenrollen zu sehen (Daten nicht gezeigt).

Vor Induktion der Ischämie fanden sich nur wenige adhärenente Leukozyten an der Gefäßwand der postkapillären Venolen. Im Gegensatz dazu gab es nach I/R eine signifikante Erhöhung der Anzahl fest adhärenenten Leukozyten im Vergleich zu scheinoperierten Kontrollen. Diese Erhöhung war bei PAI-1<sup>-/-</sup>-Mäusen wiederum signifikant reduziert.

Ebenfalls fanden sich zur Baseline nur wenige transmigrierte Leukozyten im perivaskulären Gewebe. Nach I/R stieg die Anzahl der transmigrierten Leukozyten im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollen signifikant an. Ähnlich wie bei den Ergebnissen zur festen Adhärenz, zeigte sich bei PAI-1<sup>-/-</sup>-

## Ergebnisse

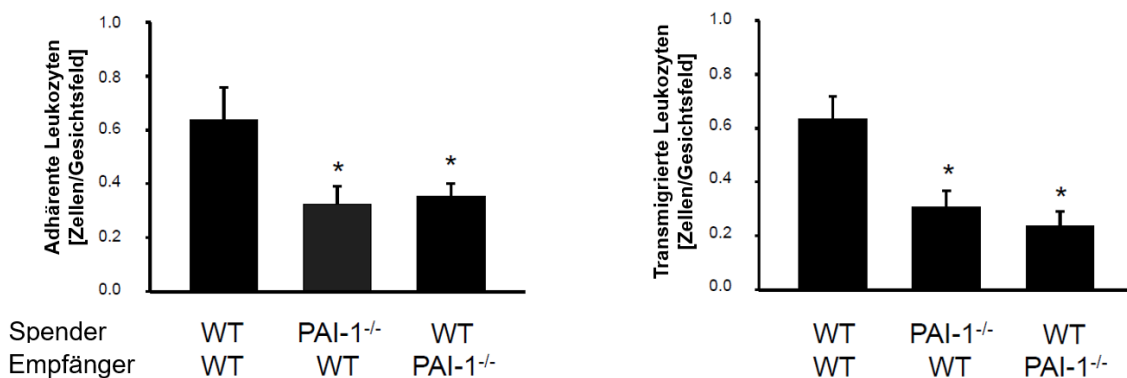
Mäusen eine signifikant geringe postischämische Zunahme der Anzahl transmigrierter Leukozyten (**Abbildung 14**).



**Abbildung 14: Einfluss von PAI-1 auf feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten nach I/R.** Quantitative Daten zur intravaskulären Adhärenz und Transmigration von Leukozyten in das postischämische Gewebe im Kremastermuskel bei scheinoperierten WT-Mäusen und bei WT- oder PAI-1-defizienten Mäusen nach I/R (Mittelwert ± SEM für n = 4 pro Gruppe; # p < 0,05, vs. scheinoperiert; \* p < 0,05, vs. WT).

### 1.3 Bedeutung von leukozytärem und nicht-leukozytärem PAI-1 für die postischämische Leukozytenrekrutierung

Um die funktionelle Bedeutung von leukozytärem und nicht-leukozytärem PAI-1 an der postischämischen Leukozytenrekrutierung zu differenzieren, wurden Zelltransferexperimente durchgeführt. Hier zeigte sich in den postkapillaren Venolen des Kremastermuskels nach I/R eine signifikant verminderte Anzahl adhärenter und transmigrierter fluoreszenzmarkierter WT-Spender-Leukozyten bei PAI-1<sup>-/-</sup>-Empfängermäusen im Vergleich zu WT-Empfängermäusen (175 Gesichtsfelder pro Kremastermuskel). Ebenso war die Zahl der adhärenter und transmigrierten Leukozyten von PAI-1<sup>-/-</sup>-Spendern bei WT-Empfängermäusen signifikant niedriger (**Abbildung 15**).

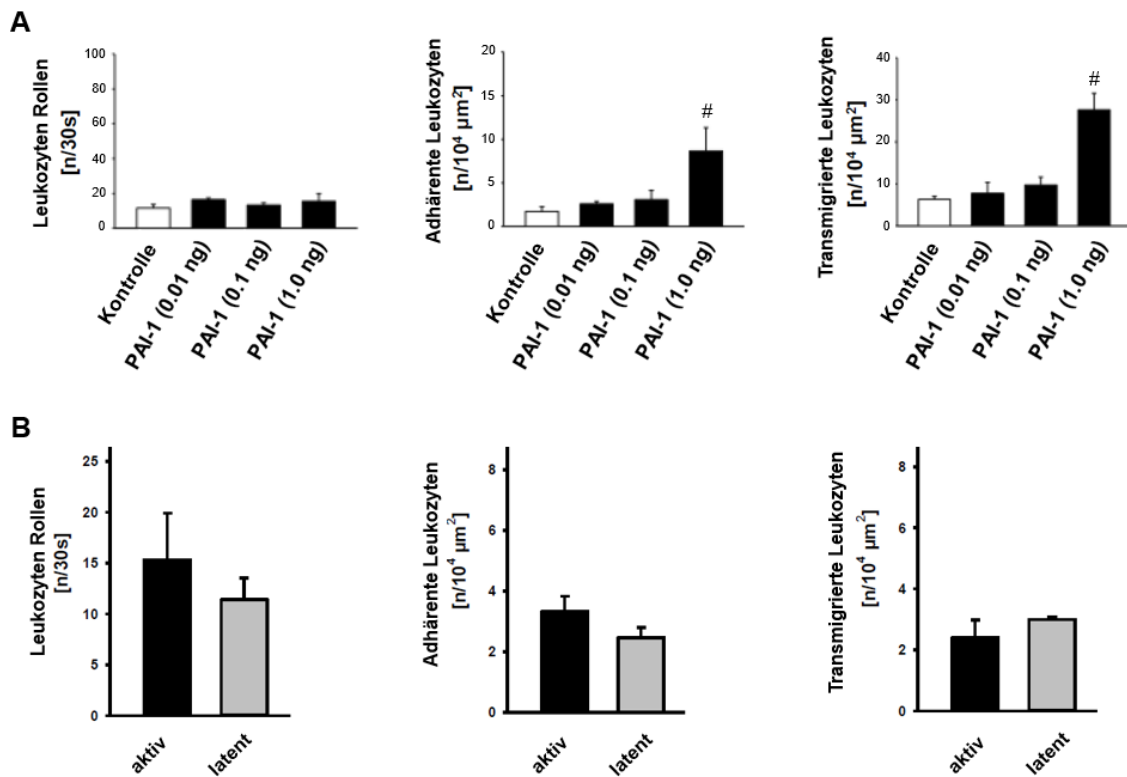


**Abbildung 15: Bedeutung von leukozytärem und nicht-leukozytärem PAI-1 für die postischämische Leukozytenrekrutierung.** Intravaskuläre Adhärenz und perivaskuläre Transmigration von transfundierten, fluoreszenzmarkierten Leukozyten im postischämischen Kremastermuskel. Ergebnisse für WT-Mäuse, die Leukozyten von WT- oder PAI-1-defizienten Spendern erhielten, sowie für PAI-1-defiziente Mäuse, die Leukozyten von WT- oder PAI-1-defizienten Spendern erhalten (Mittelwert  $\pm$  SEM für n = 6 pro Gruppe; \* p < 0,05, vs. WT→WT).

Daraufhin wurde die Auswirkung von exogen appliziertem PAI-1 untersucht. Zu diesem Zweck wurde rekombinantes murines PAI-1 in unterschiedlichen Dosen direkt in das Skrotum von WT-Mäusen injiziert (Vgl. III/6.2.1). Nach 240 Minuten PAI-1-Stimulation zeigte sich im Kremastermuskel, im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrollen (Vehikel), ein dosisabhängiger Anstieg der Anzahl fest adhärenter und transmigrierter Leukozyten. Das Leukozytenrollen war nicht signifikant verändert (**Abbildung 16A**). In weiteren Versuchen zeigte sich kein

## Ergebnisse

signifikanter Unterschied zwischen aktivem PAI-1 oder latentem (inaktivem) PAI-1 ohne antifibrinolytische Aktivität (**Abbildung 16B**).



**Abbildung 16: Einfluss von PAI-1 auf die feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten nach intraskrotaler Stimulation.** **A** Leukozytenrekutierung nach 240 Minuten intraskrotaler Stimulation mittels Injektion von unterschiedlichen Dosen rekombinanten PAI-1 oder Vehikel. Quantitative Daten für intravaskuläres Rollen und feste Adhäsion sowie die Transmigration von Leukozyten in das perivaskuläre Gewebe des Kremastermuskels (Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 5$  pro Gruppe;  $\# p < 0.05$ , vs. Kontrolle). **B** Wirkung von aktivem bzw. latentem PAI-1, ohne antifibrinolytische Aktivität, auf die Leukozytenrekutierung. Quantitative Daten für intravaskuläres Rollen und feste Adhäsion sowie die Transmigration von Leukozyten in das perivaskuläre Gewebe (Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 3$  pro Gruppe).

### 1.4 Phänotypisierung der transmigrierten Leukozyten

Mittels immunhistochemischen Färbungen gegen CD45 (Panleukozytenmarker), Ly6G (neutrophile Granulozyten) und F4/80 (Monozyten/Makrophagen), wurde der Phänotyp der transmigrierten Leukozyten in Gewebeschnitten des nach den Versuchen entnommenen Kremastermuskels identifiziert. Nach I/R oder intraskrotaler Stimulation mit PAI-1, waren mehr als 85 % der transmigrierten

## Ergebnisse

Leukozyten positiv für Ly6G und ca. 15 % der transmigrierten Leukozyten positiv für F4/80 (Daten nicht gezeigt).

### 1.5 Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahlen

Um die Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen zu gewährleisten, wurden die Gefäßdurchmesser, die mittleren Blutflussgeschwindigkeiten und die Wandschubspannung der analysierten postkapillaren Venolen ermittelt sowie die systemischen Leukozytenzahlen quantifiziert. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen allen Versuchsgruppen (**Tabelle 1**).

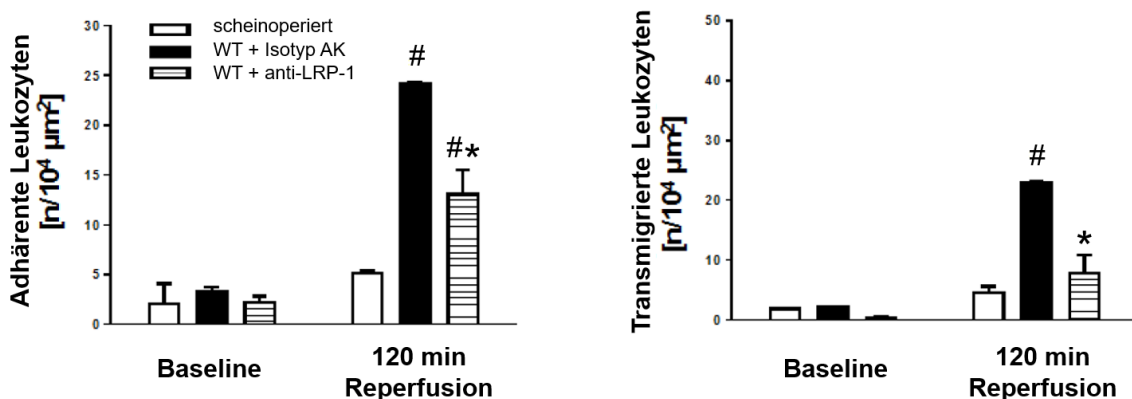
Tier	Stimulus	Behandlung	Gefäß- durchmes- ser [ $\mu\text{m}$ ]	Blutfluss- geschwin- digkeit [ $\text{mm s}^{-1}$ ]	Wandschub- spannung [ $\text{s}^{-1}$ ]	Systemische Leukozyten- zahl [ $\text{n} \times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$ ]
WT	scheinoperiert		$24,7 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,1$	$1781,1 \pm 77,0$	$5,2 \pm 1,3$
WT	I/R		$25,7 \pm 0,7$	$1,1 \pm 0,1$	$1640,2 \pm 60,7$	$4,7 \pm 0,9$
PAI-1 <sup>-/-</sup>	I/R		$24,3 \pm 0,6$	$1,1 \pm 0,1$	$1763,9 \pm 88,9$	$4,5 \pm 0,7$
WT	PBS		$24,8 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,1$	$1532,4 \pm 87,0$	$4,3 \pm 1,2$
WT	PAI-1	Vehikel	$26,1 \pm 1,2$	$1,1 \pm 0,3$	$1652,1 \pm 98,0$	$6,0 \pm 1,6$
WT	PAI-1	RAP	$23,8 \pm 1,3$	$1,1 \pm 0,1$	$1811,7 \pm 30,2$	$5,6 \pm 1,7$
WT	PBS		$25,0 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,1$	$1518,2 \pm 42,2$	$2,6 \pm 0,3$
WT	PAI-1	Vehikel	$25,4 \pm 1,1$	$1,0 \pm 0,1$	$1476,6 \pm 60,8$	$2,4 \pm 0,4$
WT	PAI-1	Anti-LRP-1	$26,2 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,1$	$1410,8 \pm 92,5$	$2,2 \pm 0,2$
WT	scheinoperiert		$24,1 \pm 0,6$	$1,0 \pm 0,1$	$1620,8 \pm 86,3$	$5,5 \pm 2,5$
WT	I/R	Vehikel	$26,7 \pm 1,2$	$1,1 \pm 0,2$	$1615,8 \pm 65,3$	$6,9 \pm 1,5$
WT	I/R	RAP	$24,4 \pm 1,0$	$1,0 \pm 0,1$	$1606,6 \pm 39,2$	$4,4 \pm 1,0$
WT	scheinoperiert		$23,2 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,1$	$1591,0 \pm 96,5$	$2,2 \pm 0,3$
WT	I/R	Vehikel	$22,4 \pm 1,6$	$0,8 \pm 0,1$	$1473,5 \pm 153,4$	$4,0 \pm 1,1$
WT	I/R	Anti-LRP-1	$22,8 \pm 1,2$	$0,9 \pm 0,1$	$1524,5 \pm 154,1$	$3,1 \pm 0,6$

**Tabelle 1: Leukozytenrekrutierung - Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahlen für die verschiedenen Versuchsgruppen** (Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 4 - 6$  pro Gruppe).

## 2 Mechanismen der PAI-1 abhängigen Leukozytenrekrutierung

### 2.1 Rolle des PAI-1 Rezeptors LRP-1 für die Regulation der postischämischen Leukozytenrekrutierung

Mehrere Studien haben gezeigt, dass PAI-1 in der Lage ist mit dem zellulären Membranrezeptor LRP-1 zu interagieren [211, 242-244]. Eine Reihe von zusätzlichen Experimenten wurde durchgeführt um die funktionelle Bedeutung von LRP-1 für die Leukozytenrekrutierung nach I/R zu analysieren. Die intraarterielle Verabreichung von RAP (rezeptor-assoziiertes Protein), einem Inhibitor von LRP-1 und anderen Vertretern der *low density lipoprotein*-Rezeptoren, oder spezifisch gegen LRP-1 gerichteten Antikörpern, 5 Minuten vor Induktion der Reperfusionphase, führte zu einer signifikanten Verringerung der intravaskulären Adhärenz und der Transmigration von Leukozyten in postischämisches Gewebe, hatte jedoch keinen Einfluss auf das intravaskuläre Leukozytenrollen (**Abbildung 17**).



**Abbildung 17: Rolle des PAI-1 Rezeptors LRP-1 für die postischämische Leukozytenrekrutierung.** Quantitative Daten zur intravaskulären Adhärenz und Transmigration von Leukozyten in das postischämische Gewebe im Kremastermuskel nach I/R in scheinoperierten WT-Mäusen und in WT-Mäusen, die mit LRP-1-AK oder Isotyp-Kontrollantikörper behandelt wurden (Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  pro Gruppe; #  $p < 0,05$ , vs. scheinoperiert; \*  $p < 0,05$ , vs. WT).

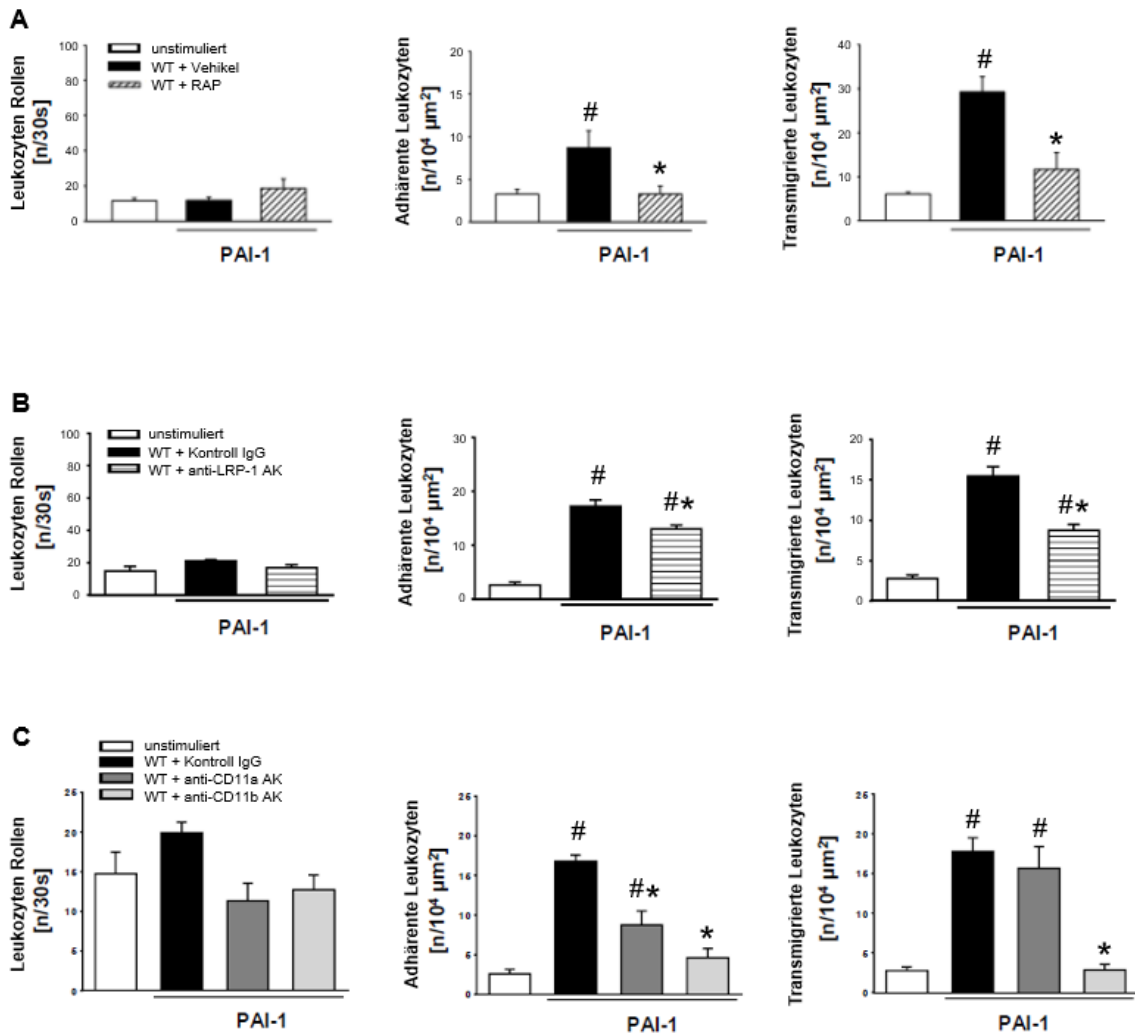
## Ergebnisse

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde durch die vorgeschaltete intraarterielle Injektion von RAP oder spezifischer LRP-1-AK, die intravaskuläre Adhärenz und Transmigration von neutrophilen Granulozyten in PAI-1 stimulierten Mäusen fast vollständig aufgehoben (**Abbildung 18A und 18B**). Hierbei erreichte die spezifische Hemmung durch LRP-1-AK mehr als 50% der hemmenden Wirkung von RAP, was nahelegt, dass LRP-1 als Hauptrezeptor für die PAI-1-abhängige Leukozytenrekrutierung dient.

Um den Mechanismus weiter aufzuschlüsseln wurden zusätzliche Experimente mit einer spezifischen Antikörperblockade gegen bestimmte Membranproteine durchgeführt. Hier zeigte sich nach der Blockade der  $\beta$ 2-Integrine Mac-1/CD11b oder in geringerem Maße von LFA-1/CD11a eine nahezu aufgehoben PAI-1-abhängige intravaskuläre Adhärenz von Leukozyten, während die Leukozyten-Transmigration in das perivaskuläre Gewebe bei der Antikörperblockade von Mac-1/CD11b, nicht aber von LFA-1/CD11a signifikant reduziert wurde (**Abbildung 18C**).



## Ergebnisse



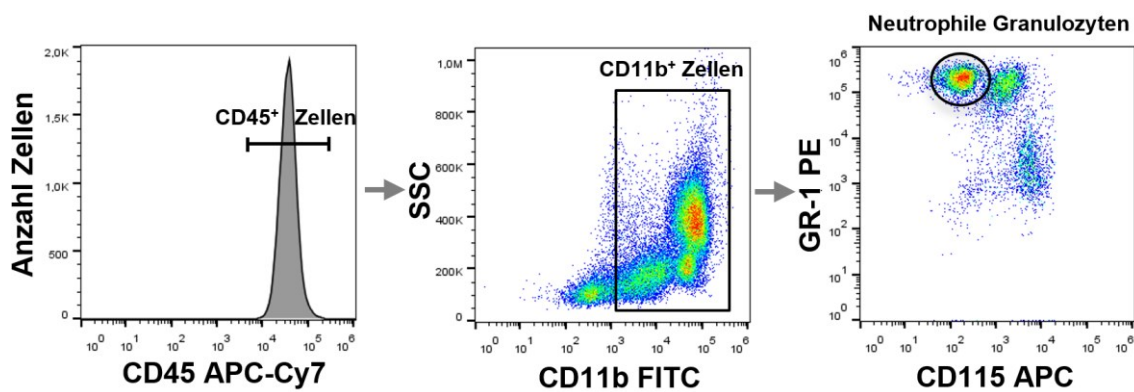
**Abbildung 18: Mechanismen der PAI-1-abhängigen Leukozytenrekrutierung.** Quantitative Daten für intravaskuläres Rollen und feste Adhärenz sowie Transmigration von Leukozyten im Kremastermuskel von WT Mäusen, die eine intraarterielle Injektion von RAP (A), LRP-1-AK (B), anti-LFA-1/CD11a-AK, anti-Mac-1/CD11b-AK (C) oder Vehikel bzw. Isotyp-Kontrollantikörper, vor Stimulation durch intraskrotale Injektion von 1µg PAI-1, erhalten haben (Mittelwert ± SEM für n = 5 pro Gruppe; # p < 0,05, vs. Kontrolle/unstimuliert; \* p < 0,05, vs. Vehikel-/Isotyp-Kontrolle).

## 2.2 Einfluss von PAI-1 auf die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen

Während den Vorgängen der intravaskulären Adhärenz und anschließenden Transmigration von Leukozyten in das perivaskuläre Gewebe spielen Interaktionen von Leukozyten-Integrinen und ihren endothelialen Bindungspartnern eine entscheidende Rolle. Da wir durch die vorangegangenen Experimente zeigen konnten, dass die durch PAI-1 hervorgerufene

## Ergebnisse

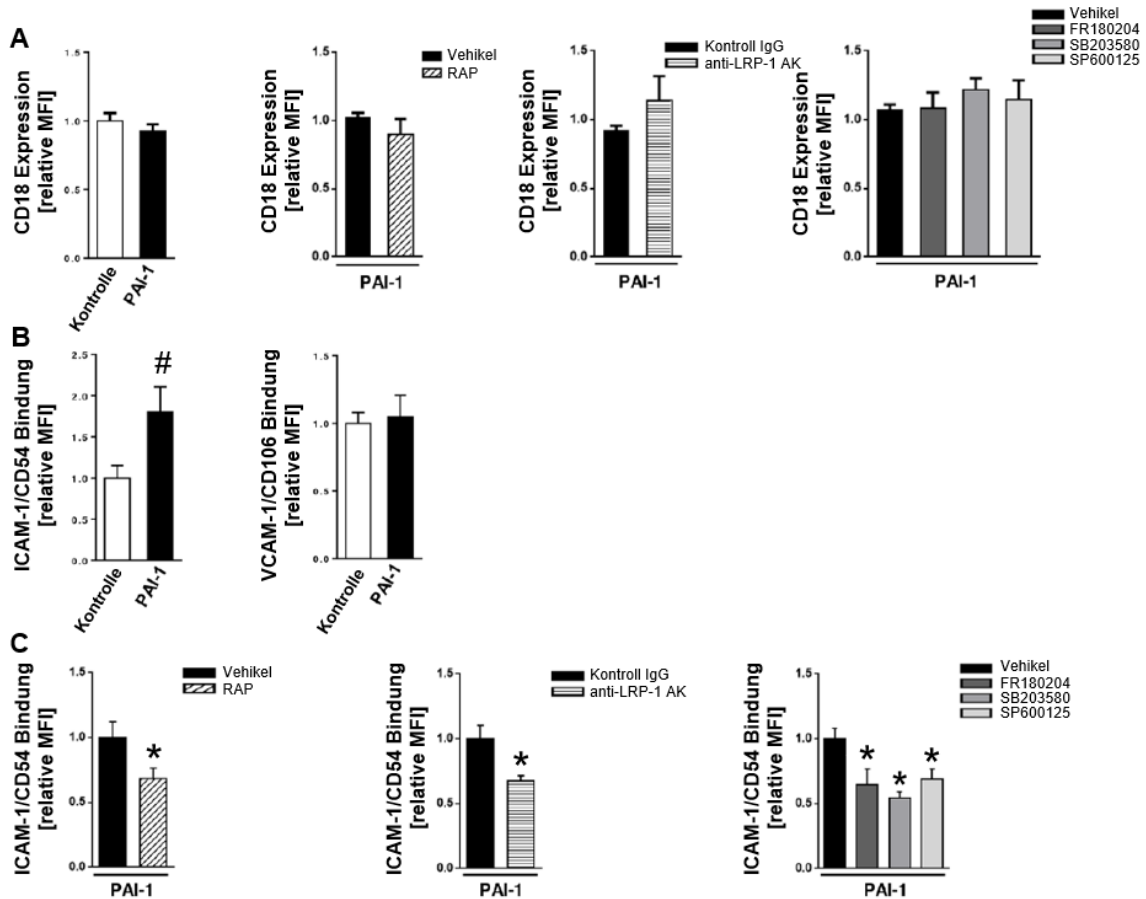
intravaskuläre Adhärenz der neutrophilen Granulozyten von  $\beta 2$ -Integrinen abhängig war (Vgl. Kap. IV/2.1), wurde die Hypothese aufgestellt, dass PAI-1 eine Affinitätsänderung der  $\beta 2$ -Integrine von neutrophilen Granulozyten induziert. Als Maß für die Konformationsänderungen der  $\beta 2$ -Integrine wurde die Bindung von ICAM-1/CD54, welches überwiegend mit  $\beta 2$ -Integrinen interagiert, und des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1/CD106, welches mit den  $\beta 1$ -Integrinen interagiert, an neutrophilen Granulozyten ( $CD45^+$ ,  $CD11b^+$ , Gr-1 $^+$ ,  $CD115^-$  Zellen), die aus dem peripheren Blut von WT-Mäusen isoliert wurden, mittels Mehrkanal-Durchflusszytometrie analysiert (**Abbildung 19**).



**Abbildung 19: Gating-Strategie zur Identifizierung von Neutrophilen.** APC, Allophycocyanin; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; SSC, *side-scattered light* (Seitwärtsstreulicht).

Die direkte Stimulation der Zellen mit PAI-1 induzierte im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrollen eine signifikante Erhöhung der Bindung von ICAM-1/CD54 an neutrophilen Granulozyten, während die Oberflächenexpression von  $\beta 2$ -Integrinen/CD18 und die Bindung von VCAM-1/CD106 an den neutrophilen Granulozyten unverändert blieb. Dieser Anstieg der ICAM-1/CD54-Bindung konnte durch die Anwendung von RAP und durch spezifische LRP-1-AK signifikant reduziert werden. Auch durch die Blockade von Kinasen des MAPK-Signaltransduktionsweges (p38, ERK 1 und 2, JNK) mittels spezifischer Inhibitoren (SB203580, FR180204, SP600125), konnte die ICAM-1/CD54-Bindung nach PAI-1-Stimulation signifikant reduziert werden (**Abbildung 20**).

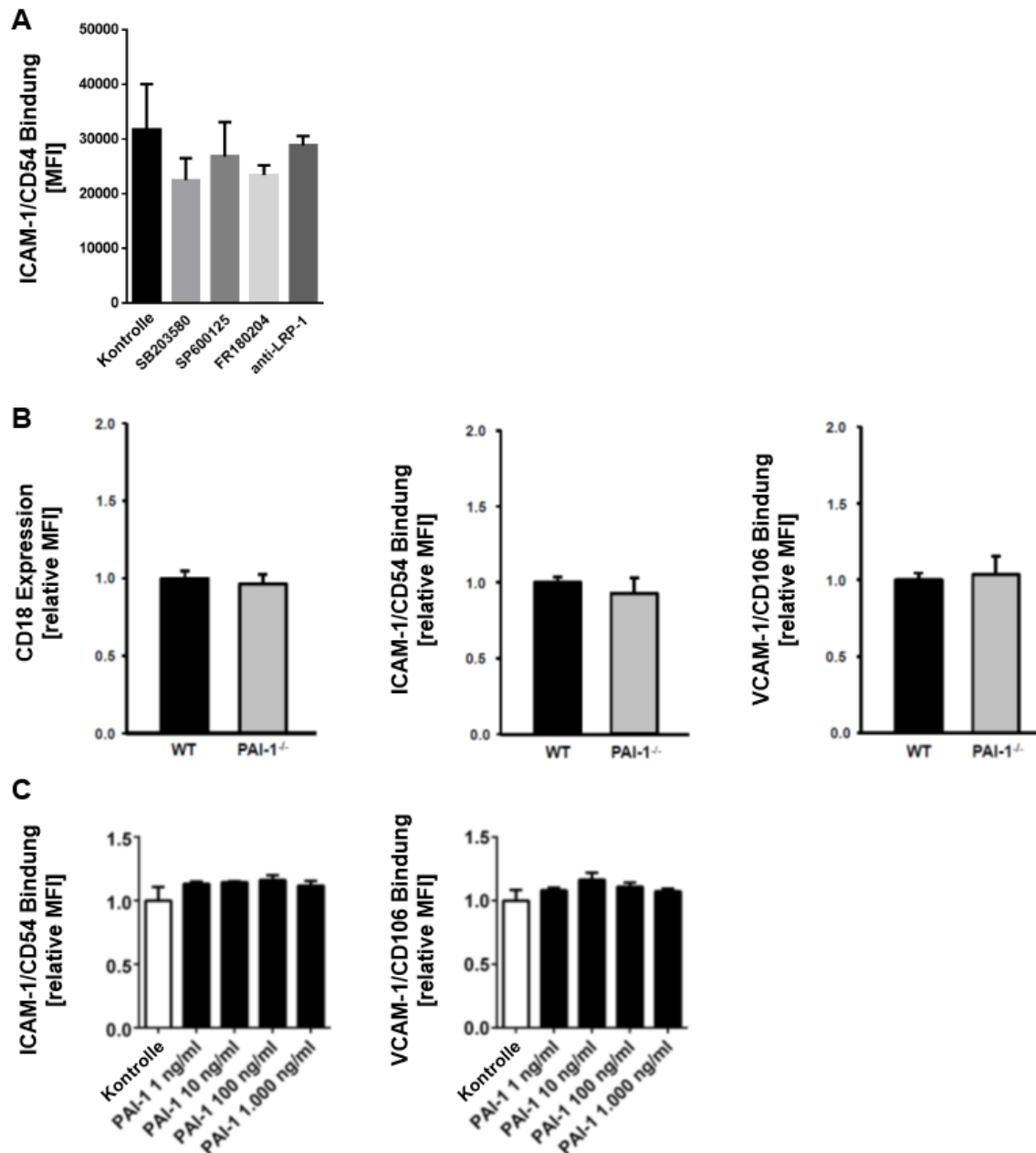
## Ergebnisse



**Abbildung 20: Einfluss von PAI-1 auf die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten.** Quantitative Daten zur Oberflächenexpression von  $\beta 2$  Integrinen/CD18 (**A**) und für die Bindung von ICAM-1/CD54 oder VCAM-1/CD106 (**B** und **C**) an neutrophilen Granulozyten, die aus WT-Mäusen durch Mehrkanal-Durchflusszytometrie isoliert wurden. Diese wurden vor Stimulation durch PAI-1 mit RAP, LRP-1-AK, verschiedenen Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Inhibitoren (FR180204, ERK1/2-Inhibitor; SB203580, p38-Inhibitor; SP600125, JNK-Inhibitor) oder Vehikel/Isotyp-Kontrollantikörpern inkubiert (Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 4-6$  pro Gruppe; #  $p < 0,05$ , vs. Kontrolle; \*  $p < 0,05$ , vs. Vehikel/Isotyp-Kontrolle). MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

Zu beachten ist, dass die Exposition gegenüber MAPK-Inhibitoren oder blockierenden LRP-1-AK die ICAM-1/CD54-Bindung an unstimulierten neutrophilen Granulozyten nicht signifikant veränderte (**Abbildung 21A**). Ebenso wurden keine signifikanten Unterschiede in der Oberflächenexpression von  $\beta 2$ -Integrinen/CD18 oder der Bindungskapazität für ICAM-1/CD54 oder VCAM-1/CD106 zwischen neutrophilen Granulozyten von WT- und PAI-1-defizienten Mäusen, die PAI-1 ausgesetzt waren, festgestellt (**Abbildung 21B**). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen änderte sich die Expression von ICAM-1/CD54 und VCAM-1/CD106 auf mikrovaskulären Endothelzellen nach Stimulation mit PAI-1 nicht (**Abbildung 21C**).

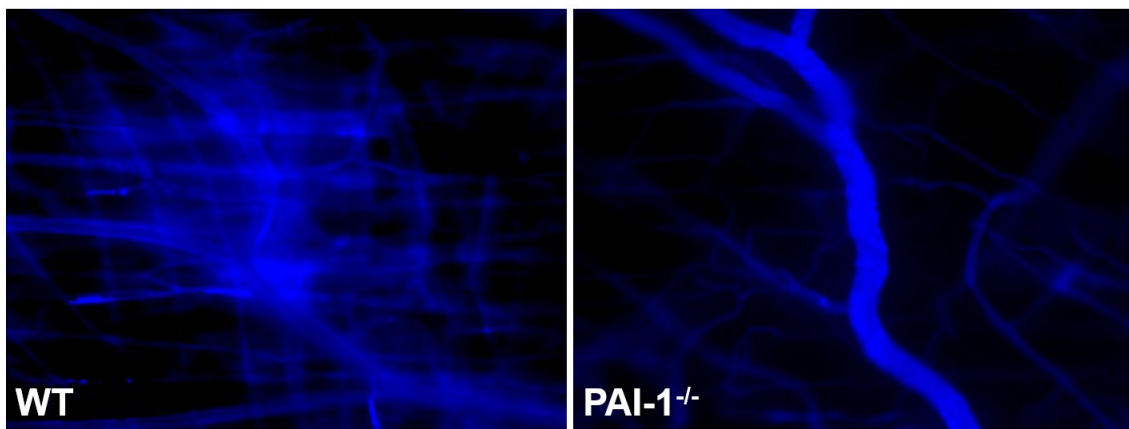
## Ergebnisse



**Abbildung 21: A Wirkung von MAPK-Inhibitoren auf die ICAM-1/CD54-Bindung an unstimulierten neutrophilen Granulozyten.** Quantitative Daten von unstimulierten neutrophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut von WT-Mäusen, die mit PBS (Kontrolle), verschiedenen MAPK-Inhibitoren oder LRP-1-AK vorinkubiert, und durch Mehrkanal-Durchflusszytometrie analysiert wurden (Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 3$  pro Gruppe). **B Auswirkung der PAI-1-Defizienz auf die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten.** Quantitative Daten zur Oberflächenexpression von  $\beta 2$  Integrinen/CD18 und für die Bindung von ICAM-1/CD54 oder VCAM-1/CD106 an neutrophilen Granulozyten, die aus dem peripheren Blut von WT- oder PAI-1<sup>-/-</sup>-Mäusen durch Mehrkanal-Durchflusszytometrie isoliert und mit rekombinantem murinem PAI-1 stimuliert wurden (Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 4$  pro Gruppe). **C Wirkung von PAI-1 auf die Expression von Adhäsionsmolekülen auf mikrovaskulären Endothelzellen.** Quantitative Daten zur Expression von ICAM-1/CD54 oder VCAM-1/CD106 auf mikrovaskulären Endothelzellen der Maus, die einer Exposition mit rekombinantem murinen PAI-1 oder Vehikel ausgesetzt waren und mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden (Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 4$  pro Gruppe).

### 3 Einfluss von PAI-1 auf die postischämische mikrovaskuläre Permeabilität

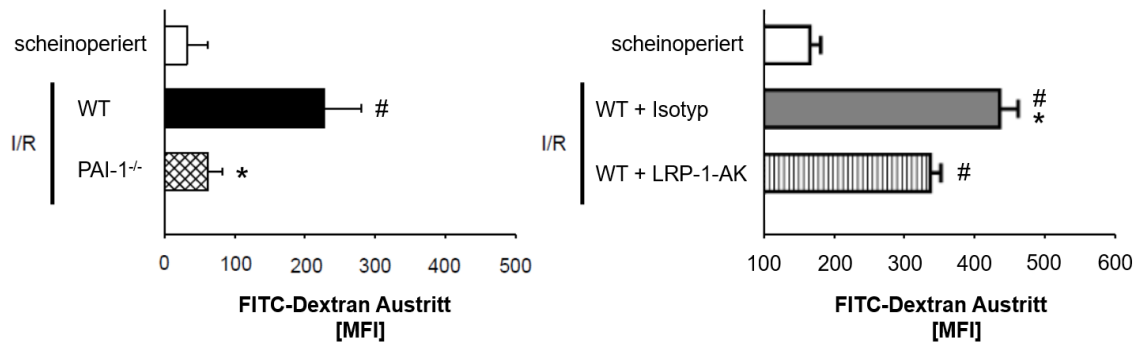
Neben der Extravasation von neutrophilen Granulozyten, ist die Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität ein weiteres Schlüsselereignis in der Pathogenese des IRS. Als Maß für die mikrovaskuläre Permeabilität wurde der Austritt von hochmolekularem FITC-Dextran aus den Gefäßen in den postischämischen Kremastermuskel mittels *In-vivo*-Fluoreszenzmikroskopie analysiert (**Abbildung 22**).



**Abbildung 22: Einfluss von PAI-1 auf die postischämische mikrovaskuläre Permeabilität.** Repräsentative *In-vivo*-Fluoreszenzmikroskopiebilder, welche den Austritt von FITC-Dextran im Kremastermuskel von WT- und PAI-1-defizienten Mäusen nach I/R zeigen.

Nach I/R (150/30 min) kam es bei WT-Tieren im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollen zu einem signifikanten Anstieg der Extravasation von FITC-Dextran. Interessanterweise fiel bei PAI-1<sup>-/-</sup>- und WT-Mäusen, die mit blockierenden LRP-1-AK behandelt wurden, dieser Anstieg signifikant geringer aus (**Abbildung 23**).

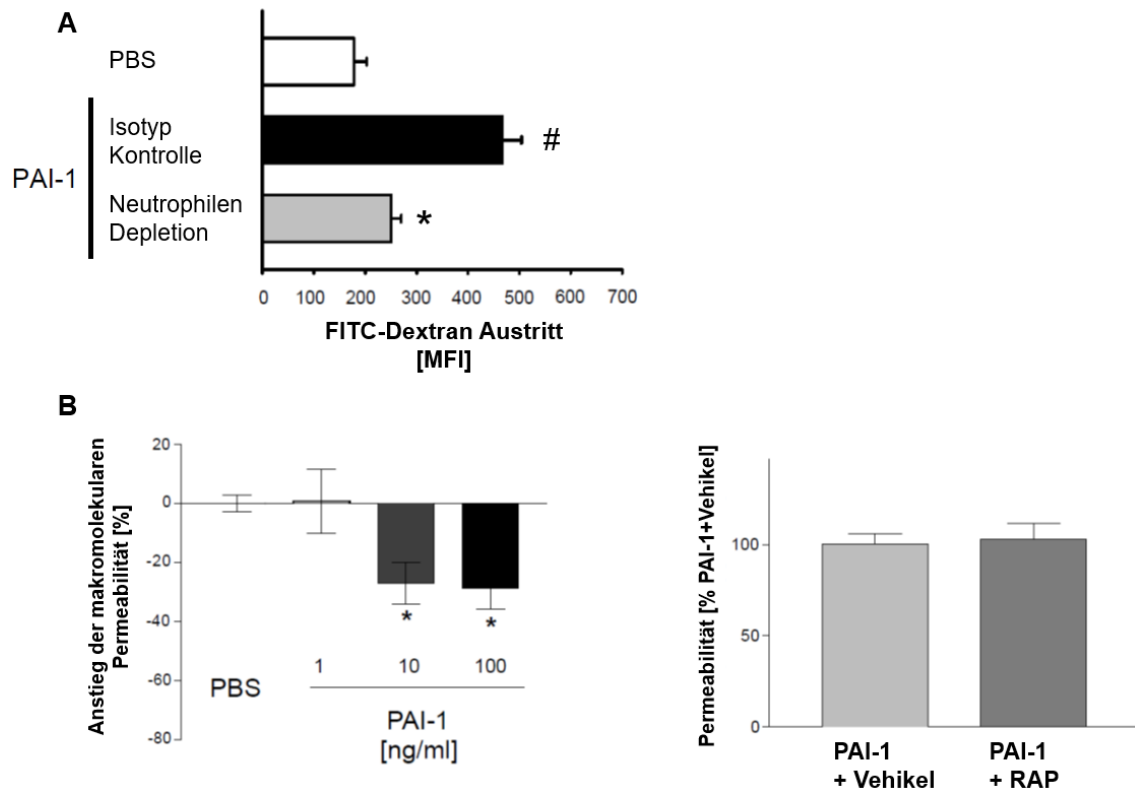
## Ergebnisse



**Abbildung 23: Einfluss von PAI-1 auf die postischämische mikrovaskuläre Permeabilität.** Quantitative Daten für den FITC-Dextran-Austritt im Kremastermuskel in scheinputerierten WT Mäusen, in WT oder PAI-1-defizienten Mäusen nach I/R (30/150 min), sowie in WT Mäusen nach I/R, die mit LRP-1-AK oder Isotyp-Kontrollantikörper behandelt wurden (Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 4-6$  pro Gruppe; #  $p < 0.05$ , vs. scheinputeriert; \*  $p < 0,05$ , vs. WT). MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

Zur Analyse der genauen Mechanismen des PAI-1-vermittelten Effekts auf die mikrovaskuläre Permeabilität, wurden weitere Experimente durchgeführt. Die Stimulation durch intraskrotale Injektion von PAI-1 führte zu einer signifikanten Permeabilitätssteigerung im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen. Nach Depletion der neutrophilen Granulozyten und intraskrotaler PAI-1-Stimulation war diese Steigerung wiederum fast vollständig aufgehoben. *In vitro* induzierte die Stimulation konfluenter HMEC Endothelzellschichten mit PAI-1 eine dosisabhängige Reduktion der makromolekularen Permeabilität. Dieser Effekt konnte durch die Anwendung von RAP nicht aufgehoben werden (**Abbildung 24**).

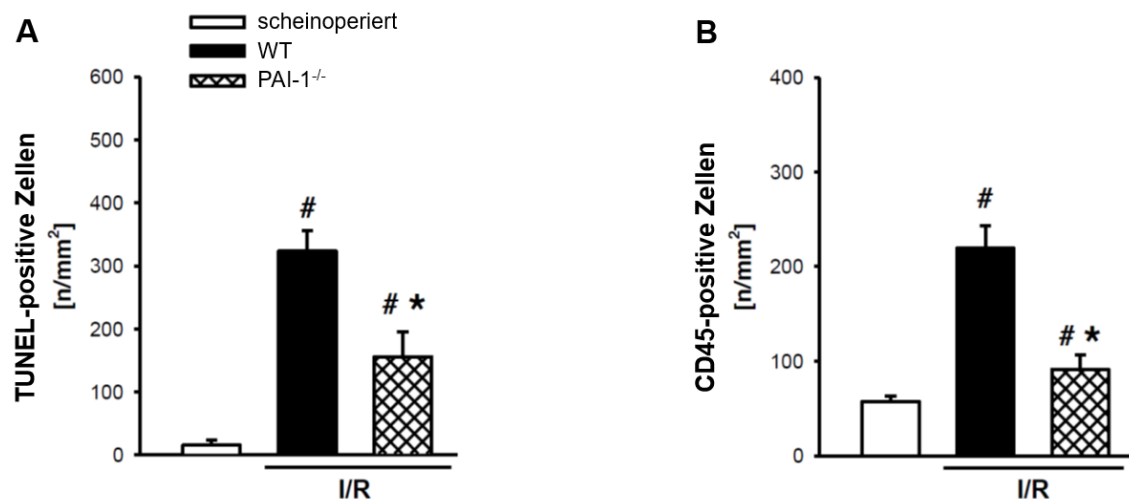
## Ergebnisse



**Abbildung 24: Einfluss von PAI-1 auf die mikrovaskuläre Permeabilität nach Stimulation.** **A** Quantitative Daten für den FITC-Dextran-Austritt im Kremastermuskel in unstimulierten WT-Mäusen sowie in WT-Mäusen, die mit Neutrophilen-depletierenden anti-Ly6G-AK oder Isotyp-Kontrollantikörper behandelt wurden und eine intraskrotale Stimulation mit rekombinatem murinen PAI-1 erhielten (Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 4-6$  pro Gruppe; #  $p < 0.05$ , vs. PBS; \*  $p < 0,05$ , vs. Isotyp-Kontrolle). **B** Quantitative Daten für die Analyse der makromolekularen Permeabilität für FITC-Dextran *in vitro*, in konfluenten HMEC-Endothelzellschichten, die unterschiedlichen Dosen von rekombinatem humanem PAI-1 sowie RAP oder Vehikel ausgesetzt waren (Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 3-4$  pro Gruppe; \*  $p < 0,05$ , vs. PBS).

#### 4 Rolle von PAI-1 bei der warmen Ischämie der Leber

Um oben genannte Erkenntnisse in ein klinisches Setting zu übertragen, wurde die Rolle von PAI-1 im I/R-Modell der Leber analysiert (Vgl. Kap. III/4.1.6). Die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen, die der Darstellung von Zellkernen apoptotischer/nekrotischer Zellen dient (Vgl. Kap. III/5.2), wurde als Maß für den Zelltod in Lebergewebsschnitten quantifiziert. In scheinoperierten Tieren wurden nur wenige TUNEL-positive Zellen nachgewiesen. Nach I/R (90/120 min) der Leber war die Anzahl erwartungsgemäß signifikant erhöht. Diese Erhöhung war bei PAI-1<sup>-/-</sup>-Mäusen wiederum signifikant vermindert (**Abbildung 25A**). In den Lebern von scheinoperierten Kontrollmäusen wurde nach immunhistochemischer Färbung nur eine geringe Anzahl extravasierter Leukozyten im perivaskulären Gewebe gefunden. Nach I/R kam es zu einem signifikanten Anstieg der Zahl der in das Lebergewebe eingewanderten Leukozyten. Dabei waren mehr als 70% Ly6G-positive neutrophile Granulozyten. Dieser Anstieg war bei PAI-1<sup>-/-</sup>-Mäusen wiederum signifikant reduziert (**Abbildung 25B**).



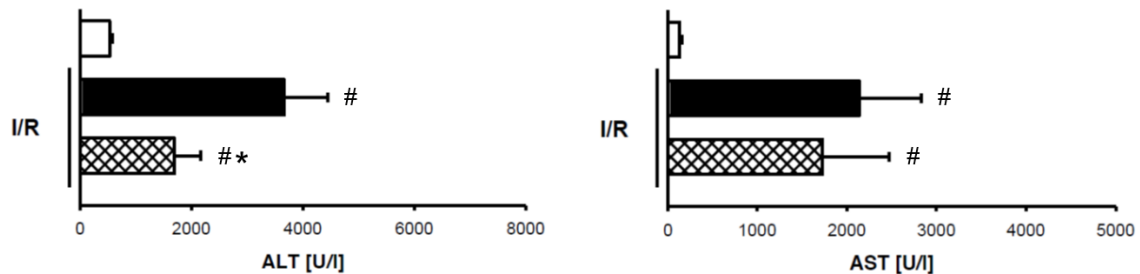
**Abbildung 25: Einfluss von PAI-1 auf den Zelltod und die Leukozytenrekrutierung nach I/R der Leber.** Quantitative Daten für (A) TUNEL- und (B) CD45-positive Zellen in der Leber von scheinoperierten WT-Mäusen sowie WT- und PAI-1-defizienten Mäusen nach I/R (90/120 min) (Mittelwert  $\pm$  SEM für n = 6 pro Gruppe; # p < 0,05, vs. scheinoperiert; \* p < 0,05, vs. WT).

Darüber hinaus wurden die Serumspiegel der ALT und AST als weiteres Maß für die Lebergewebeschädigung bestimmt. Nach I/R gab es im Vergleich zu den



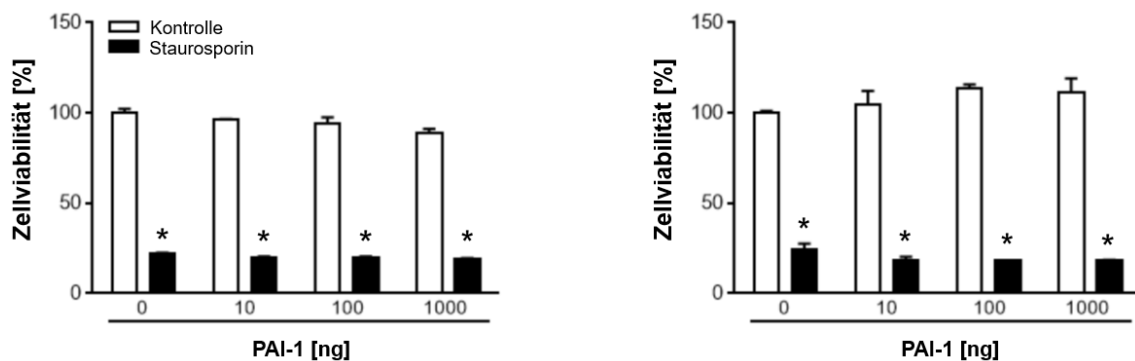
## Ergebnisse

scheinoperierten Kontrollen einen signifikanten Anstieg der Serumspiegel von ALT und AST. In PAI-1-defizienten Mäusen wurde dieser Transaminasen-Anstieg nach I/R abgeschwächt; die Abnahme der AST erreichte jedoch im Gegensatz zur ALT keine statistische Signifikanz (**Abbildung 26**).



**Abbildung 26: Einfluss von PAI-1 auf das Ausmaß der Lebergewebeschädigung nach I/R.** Quantitative Daten für die Serumspiegel der Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) in scheinoperierten WT-Mäusen sowie WT- und PAI-1-defizienten Mäusen nach I/R der Leber (Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 6$  pro Gruppe; #  $p < 0.05$ , gegen scheinoperiert; \*  $p < 0.05$ , gegen WT).

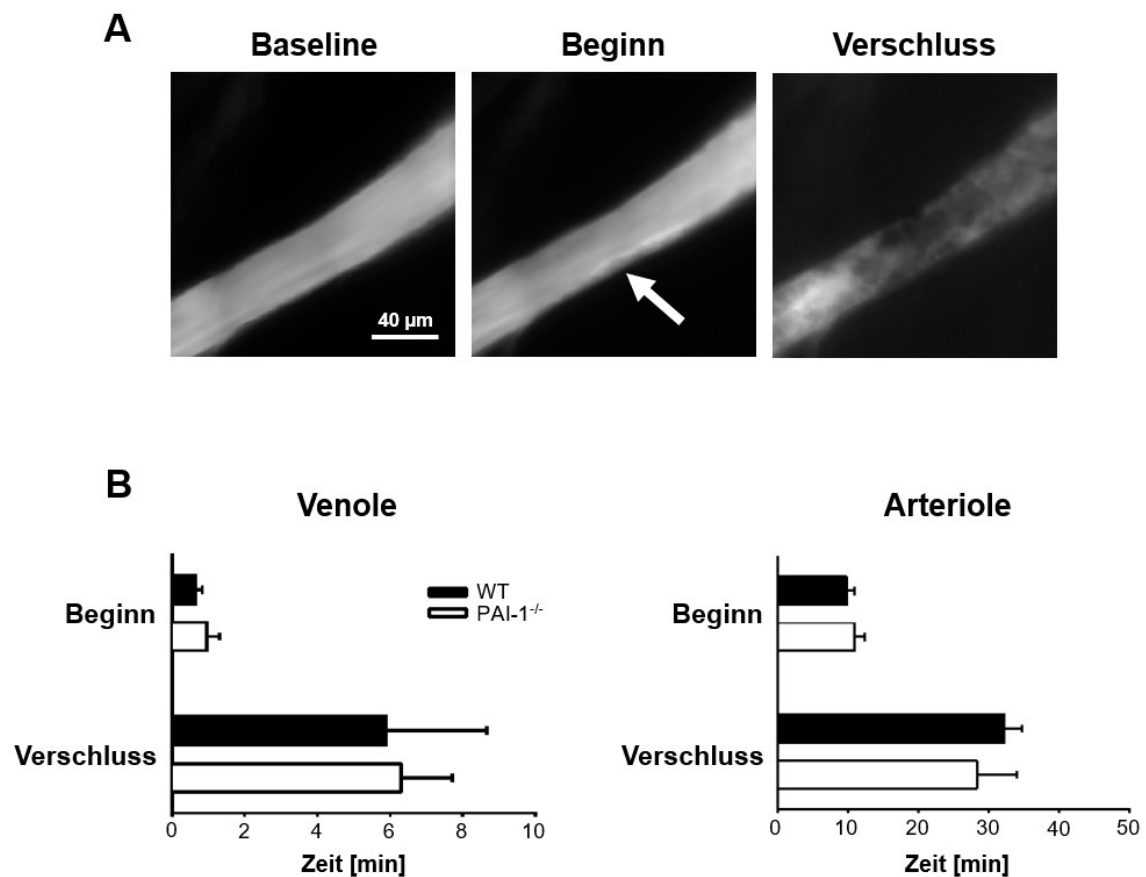
Mögliche direkte zytotoxische oder -protektive Effekte von PAI-1 wurden durch Alamar-Blue-Reduktionsanalysen (Vgl. Kap. III/5.7) mit aus WT-Mäusen isolierten Hepatozyten untersucht. Hier hatte die Exposition mit PAI-1 keinen Einfluss auf die Zellviabilität, während die Exposition mit der Positivkontrolle Staurosporin die Zellviabilität in dosisabhängiger Weise signifikant reduzierte (**Abbildung 27**).



**Abbildung 27: Einfluss von PAI-1 auf die Zellviabilität von Hepatozyten.** Quantitative Daten der Viabilität von Hepatozyten die aus WT-Mäusen isoliert wurden und unterschiedlichen Dosen von rekombinantem murinen PAI-1, Staurosporin (Positivkontrolle) oder Vehikel ausgesetzt waren (Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n = 3$  pro Gruppe; \*  $p < 0.05$ , gegenüber der Kontrolle).

## 5 Rolle von PAI-1 bei der mikrovaskulären Thrombusbildung

Im Hinblick auf seine hemmende Wirkung auf die Plasminogenaktivatoren uPA und tPA, könnte ein Mangel an PAI-1 überschießende fibrinolytische Effekte haben, welche eine Störung des physiologischen Gleichgewichts zwischen mikrovaskulärer Fibrinolyse und Hämostase zur Folge hätte. Um den Einfluss auf von PAI-1 auf diese Prozesse zu analysieren, wurde die mikrovaskuläre Thrombusbildung im Kremastermuskel durch photochemische Schädigung des Gefäßendothels in Arteriolen und Venolen ausgelöst und untersucht (Vgl. Kap. III/4.2.3). Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen PAI-1<sup>-/-</sup>- und WT-Mäusen bezüglich der Zeit bis zum Beginn der Thrombusbildung, als auch der Zeit bis zum kompletten Verschluss der Gefäße (**Abbildung 28**).



**Abbildung 28: Rolle von PAI-1 bei der mikrovaskulären Thrombusbildung.** (A) Repräsentative Bilder des Verlaufs einer photochemisch-induzierten Thrombusbildung in einer postkapillären Venole. (B) Quantitative Daten für den Beginn der Thrombusbildung und dem Stillstand des Blutflusses (Verschluss) in Venolen und Arteriolen in WT- und PAI-1-defizienten Mäusen (Mittelwert  $\pm$  SEM für n = 4 pro Gruppe).

## Ergebnisse

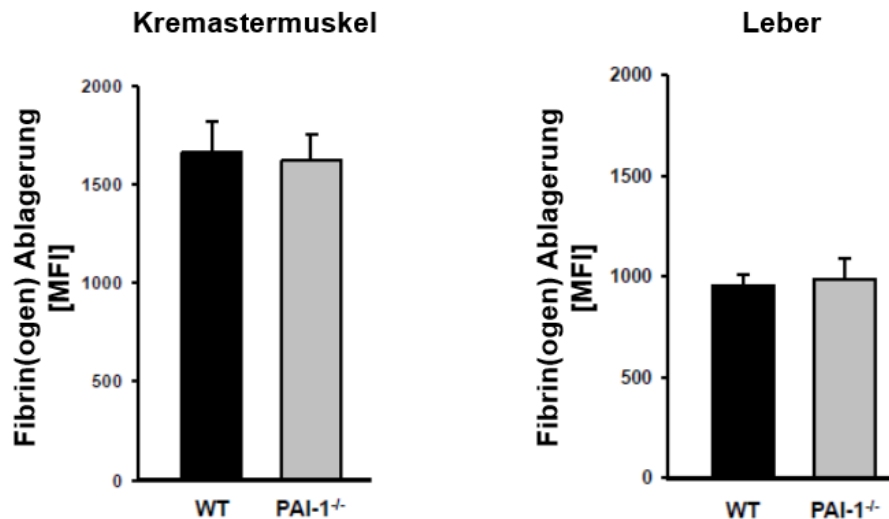
Um die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen zu gewährleisten, wurden bei allen Experimenten die mikrohämodynamischen Parameter (Gefäßdurchmesser, mittlere Blutflussgeschwindigkeiten, Wandschubspannung) gemessen und die Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran sowie die systemischen Leukozyten- und Thrombozytenzahlen bestimmt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (**Tabelle 2**).

Tier		Gefäß- durchmesser [µm]	Mittlere Fluoreszenzintensität [Grauwert]	Systemische Thrombo- zytenzahl [n x 10 <sup>6</sup> µl <sup>-1</sup> ]	Systemische Leukozytenzahl [n x 10 <sup>6</sup> µl <sup>-1</sup> ]
WT	Arteriolen	33,7 ± 0,9	596,2 ± 59,8	570,4 ± 119,1	6,9 ± 0,4
PAI-1 <sup>-/-</sup>	Arteriolen	36,0 ± 1,7	537,6 ± 51,8	709,4 ± 75,7	6,8 ± 1,1
WT	Venolen	51,7 ± 4,5	774,6 ± 83,0	570,4 ± 119,1	6,9 ± 0,4
PAI-1 <sup>-/-</sup>	Venolen	45,1 ± 2,6	712,6 ± 80,0	709,4 ± 75,7	6,8 ± 1,1

**Tabelle 2: Mikrovaskuläre Thrombusbildung - FITC-Dextran Fluoreszenzintensität, systemischen Leukozyten- und Thrombozytenzahlen, sowie mikrohämodynamische Parameter der verschiedenen Versuchsgruppen (Mittelwert ± SEM für n = 4 - 5 pro Gruppe).**

## 6 Einfluss von PAI-1 auf die postischämische Ablagerung von Fibrin(ogen) nach I/R

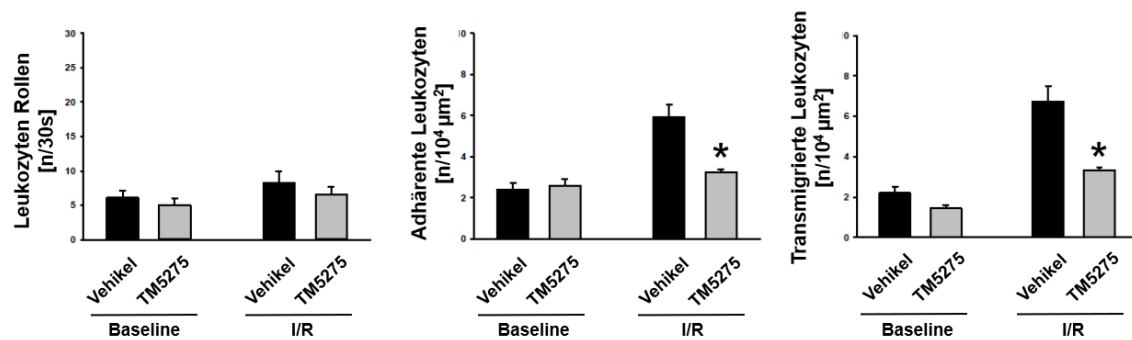
Da in einigen früheren Studien die Bedeutung des fibrinolytischen Systems auf den IRS hauptsächlich dem Einfluss auf intravaskuläre Fibrinablagerungen zugeschrieben wurde [229, 245-247], wurde die postischämische Ablagerung von Alexa488-konjugiertem Fibrin(ogen) in den postkapillären Venolen des Kremastermuskel und den Lebersinusoiden untersucht. Hier gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen WT- und PAI-1<sup>-/-</sup>-Mäusen (**Abbildung 29**).



**Abbildung 29: Auswirkung des PAI-1-Mangels auf die postischämische intravaskuläre Ablagerung von Fibrin(ogen).** Quantitative Daten für die mittlere intravaskuläre Fluoreszenzintensität (MFI) von Alexa488-konjugierten Fibrin(ogen) in den postkapillären Venolen des Kremastermuskels und den Lebersinusoiden bei WT- oder PAI-1-defizienten Mäusen nach I/R (30 bzw. 90 min Ischämie, 120 min Reperfusion) (Mittelwert  $\pm$  SEM für n = 3 pro Gruppe).

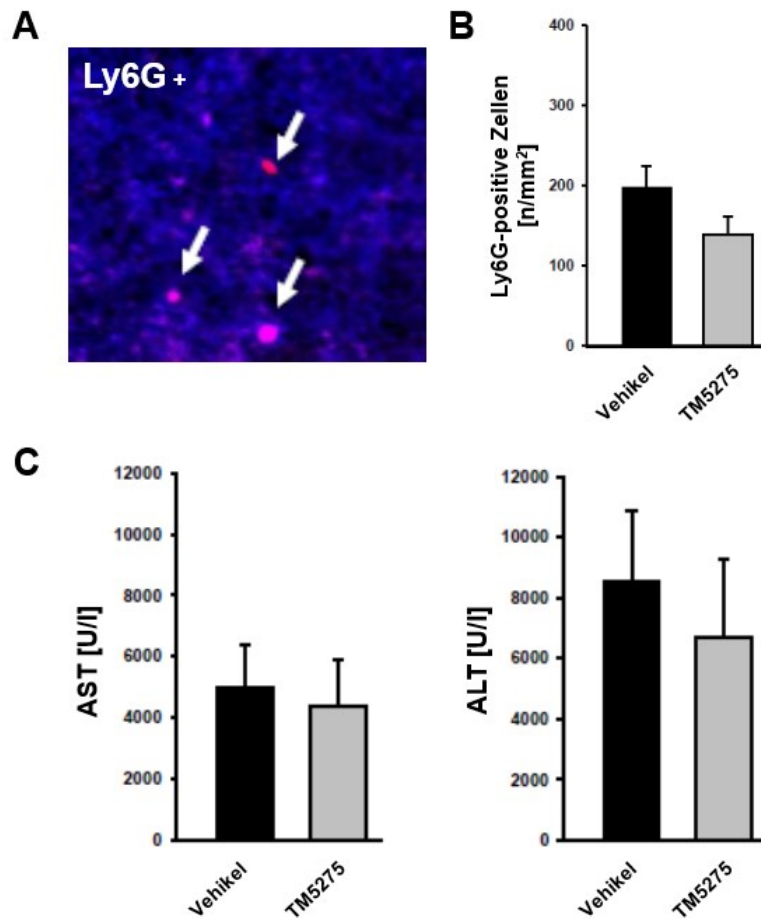
## 7 Wirkung des PAI-1-Inhibitors TM5275 auf die postischämische Leukozytenrekrutierung und Leberschädigung

In weiteren Versuchen wurde die Wirkung des spezifischen PAI-1-Inhibitors TM5275 auf die Leukozytenrekrutierung und Leberschädigung nach I/R getestet. Die intraarterielle Verabreichung dieses Präparats 5 Minuten vor Beginn der Reperusionsphase verringerte die intravaskuläre Adhärenz und anschließende Transmigration von neutrophilen Granulozyten in das perivaskuläre Gewebe im Kremastermuskel von WT-Mäusen signifikant im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ein Einfluss auf das Rollen der Leukozyten war nicht nachzuweisen (**Abbildung 29**).



**Abbildung 30: Wirkung des PAI-1-Inhibitors TM5275 auf die postischämische Leukozytenrekrutierung im Kremastermuskel.** Quantitative Daten für intravaskuläres Rollen und Adhärenz, sowie die Transmigration von Leukozyten im postischämischen Kremastermuskel in WT-Mäusen nach I/R, die mit TM5275 oder Vehikel behandelt wurden (Mittelwert  $\pm$  SEM für n = 5 pro Gruppe; \* p < 0,05, vs. Vehikel).

Im Gegensatz dazu zeigten sich die Anzahl der extravasierten neutrophilen Granulozyten in der postischämischen Leber sowie die Serumspiegel der ALT und AST durch die Anwendung von TM5275 nur geringfügig, jedoch nicht signifikant verändert (**Abbildung 31**).



**Abbildung 31: Wirkung von TM5275 auf die postischämische hepatische Leukozytenrekrutierung und Gewebeschädigung.** (A) Repräsentative Aufnahme von Ly6G-positiven Leukozyten (Pfeile), die in die postischämische Leber rekrutiert wurden (Vergrößerung x 400). Quantitative Daten für (B) Ly6G-Positive Zellen in der postischämischen Leber und für (C) Serumwerte von AST und ALT in WT-Mäusen, die mit TM5275 oder Vehikel behandelt wurden (Mittelwert  $\pm$  SEM für n = 5 pro Gruppe).

## **V Diskussion**

PAI-1 ist ein Serinprotease-Inhibitor welcher primär dem fibrinolytischen System zugeordnet wird, wo er als wichtigster Inhibitor der Plasminogenaktivatoren tPA und uPA die Fibrinolyse hemmt. Das fibrinolytische System schützt den Körper endogen vor intravaskulären Thrombosen in dem die Effektorprotease Plasmin Fibrinpolymere, die als Gerinnungsprodukte Blutungen stillen, abbaut. In letzter Zeit sind zunehmend Wechselwirkungen zwischen dem fibrinolytischen System und dem Immunsystem im Ischämie-Reperfusionprozess bekannt geworden, sodass PAI-1 mittlerweile auch als wichtiger Modulator in dessen Pathogenese anerkannt wird [226-232]. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch bislang kaum verstanden. Schlüsselereignisse der postischämischen Entzündungsreaktion sind die Akkumulation von Leukozyten in der Mikrovaskulatur und deren Infiltration des perivaskulären Gewebes, sowie die Störung der mikrovaskulären Endothelzellintegrität, wodurch die ordnungsgemäße Reperfusion beeinträchtigt und die ischämische Gewebeschädigung verstärkt wird [27, 248]. Um den Beitrag von PAI-1 an diesem Prozess zu analysieren und die dahintersteckenden Mechanismen genauer zu charakterisieren, haben wir verschiedene *In-vivo*- und *Ex-vivo*-Mikroskopietechniken in teils genetisch veränderten Mäusen eingesetzt.

### **1 Diskussion der verwendeten Methoden**

#### **1.1 Versuchstiere**

Da der Ischämie-Reperfusionprozess einem hochkomplexen Zusammenspiel unterschiedlicher Mechanismen unterliegt und somit vom intakten Gesamtorganismus abhängig ist, eignen sich *In-vivo*-Tiermodelle hervorragend dazu, einzelne Teilschritte dieses Prozesses gezielt zu untersuchen. Unsere Experimente wurden an Mäusen durchgeführt, da die Maus immunologisch gut charakterisiert ist, eine starke Übereinstimmung mit dem humanen Immunsystem besteht und eine breite Palette spezifischer Antikörper als auch genetisch veränderte Tiere verfügbar sind [249-251]. So kann die biologische Relevanz

einzelner molekularer Mechanismen gezielt untersucht werden. In unseren Experimenten wurden WT und PAI-1-defiziente C57BL/6J Stämme verwendet, welche phänotypisch identisch waren. Laut Züchter (*The Jackson Laboratory*, Bar Harbor, Maine, USA) sind die PAI-1-defizienten Mäuse normal lebensfähig und fruchtbar. Unterschiede sind der milde hyperfibrinolytische Zustand und eine beschleunigte Hautwundheilung [233, 252].

### 1.2 Versuchsmodelle

Das sogenannte Kremastermuskelmodell wird häufig für *In-vivo*-Untersuchungen der Mikrozirkulation verwendet, da der Kremastermuskel wichtige Besonderheiten wie eine fast zweidimensionale Gefäßstruktur und eine hohe Gefäßdichte bietet. Zudem gibt es, im Gegensatz zu parenchymalen Organen, im Muskelgewebe einen gut definierten perivaskulären Raum, was von besonderer Bedeutung für die Analyse der interstitiellen Migration von Leukozyten ist [253]. Durch die anatomisch günstige Lokalisation der zuführenden Gefäße kann mit Hilfe einer Gefäßklemme vergleichsweise einfach eine temporäre Ischämie und anschließende Reperfusion des Gewebes erzielt werden. Darüber hinaus lassen sich durch diverse Applikationswege unterschiedliche Entzündungsformen induzieren, wie beispielsweise eine systemische Entzündung durch intraperitoneale Applikation oder eine lokale Entzündung durch direkte intraskrotale Injektion von Entzündungsmediatoren. Die chirurgische Präparation der Kremastermuskels wurde wie ursprünglich von Baez beschrieben, mit geringfügigen Modifikationen durchgeführt [234, 235]. Durch die geringe Dicke des murinen Kremastermuskels lassen sich nach sorgfältiger Präparation Arteriolen, Venolen und das perivaskuläre Gewebe überlagerungsfrei mittels IVM in hervorragender Bildqualität darstellen und Prozesse wie die Leukozytenrekutierung, mikrovaskuläre Permeabilitäts-Veränderungen oder die Thrombusbildung visualisieren [254]. Ein Nachteil des Kremastermodells ist, dass bereits durch die Präparation eine geringe Entzündungsreaktion im Sinne eines leichten Leukozytenrollens hervorgerufen wird, wodurch dieser Parameter etwas eingeschränkt zu beurteilen ist. Der



Einfluss der chirurgischen Präparation auf die in dieser Arbeit relevanteren Parameter der Leukozytenadhärenz und -migration scheint jedoch zu vernachlässigen zu sein.

Mit anderen Modellen wie beispielsweise dem murinen Ohrmodell lassen sich mittels 2-Photonen-Mikroskopie ebenfalls inflammatorische Prozesse in der Mikrozirkulation visualisieren [255, 256]. Vorteile sind hierbei die technisch einfachere Präparation und dadurch kaum festzustellende Induktion einer präparationsassoziierten Entzündung sowie die Möglichkeit längerer Beobachtungszeiträume der Mikrozirkulation als beim Kremastermuskelmodell. Nachteile des Ohrmodells ist die eingeschränkte Bildqualität. Um initiale Erkenntnisse aus den Versuchen am Kremastermuskel in ein weiteres klinisches Setting zu übertragen, wurde die Rolle von PAI-1 im I/R-Modell der Leber analysiert. Dieses Modell ist zur Untersuchung von Entzündungsvorgängen in der hepatischen Mikrozirkulation etabliert [26, 257-261].

Um den Einfluss von PAI-1 auf die mikrovaskuläre Thrombusbildung zu untersuchen wurde das Modell der photochemischen Endothelzellaktivierung im Kremastermuskel verwendet. Durch Injektion von FITC-Dextran und anschließender Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 488 nm wird im belichteten Areal ein photochemischer Schaden des Gefäßendothels hervorgerufen, welcher zu einer gut reproduzierbaren Thrombose führt [256, 262, 263]. Das etablierte Modell erlaubt die Untersuchung der Thrombusbildung in Echtzeit, was eine einfache Erfassung quantitativer Parameter wie beispielsweise der Dauer bis zum kompletten Gefäßverschluss ermöglicht. Dabei kommt es lediglich zu einer Endothelzellaktivierung und keiner höhergradigen Endothelschädigung [264]. Im Gegensatz dazu führen andere Methoden wie die durch Eisenchlorid-induzierte Thrombose oder Laser-Modelle zur Schädigung des Endothels mit Freilegung von subendothelialen Strukturen, was die Thrombusbildung durch Interaktion mit Thrombozyten beeinflussen kann [265, 266].

Um zwischen dem Beitrag von leukozytärem und nicht-leukozytärem PAI-1 an der postischämischen Leukozytenrekutierung zu differenzieren, wurde eine

etablierte Zelltransfertechnik eingesetzt [237]. Hierfür werden Knochenmarksleukozyten aus getöteten Spendermäusen (WT oder PAI-1<sup>-/-</sup>) isoliert, gefärbt, intravenös in die Empfängermause injiziert und anschließend quantifiziert. Da die Knochenmarkszellen zu >90% aus neutrophilen Granulozyten bestehen, lassen sich anschließend, mittels IVM des Kremastermuskels, das Leukozytenrollen, die Adhärenz und die Rekrutierung ins perivaskuläre Gewebe gut untersuchen [267]. Ein Nachteil ist, dass die exogenen Zellen möglicherweise bereits während der Aufbereitung aktiviert werden und so zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen kann. Bei Alternativtechniken, wie der Erstellung von Chimären durch Knochenmarkstransplantation ist der Vorteil, dass es sich um endogene Zellen handelt. Jedoch kommt es durch eine Ganzkörperbestrahlung vor Transplantation zu einer starken Immunsuppression, wodurch es zu Komplikationen wie ungewollten Infektionen kommen kann. Zudem können direkte Strahlenschäden zu entzündlichen Veränderungen bis hin zum Schock führen [268].

### 1.3 Intravitalmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge in verschiedenen Organen [261, 269, 270]. Mittels Fluoreszenzfarbstoffen lassen sich verschiedenste Zielstrukturen darstellen und deren Interaktionen beobachten. Ein limitierender Faktor der Fluoreszenz-IVM ist der schwache Bildkontrast, welcher durch die Benutzung der sogenannten *reflected light oblique transillumination* (RLOT)-Mikroskopie umgangen werden kann. Bei dem an unserem Institut etablierten Verfahren wird nah-infrarotes Licht nachdem es das Objektiv und das Untersuchungspräparat durchdringt an einem darunterliegenden schrägen Spiegel reflektiert, um erneut das Präparat zu durchdringen und im Gewebe in unterschiedliche Phasengradienten zu brechen. Dadurch ergeben sich diverse Vorteile. Durch das nah-infrarote Licht wird in unserem Modell einerseits die Myoglobinextinktion im Kremastermuskel reduziert und transmigrierte Leukozyten können kontrastreicher visualisiert werden,

andererseits sind durch die Benutzung von langwelligem Licht längere Beobachtungszeiten bei gleichzeitiger Minimierung der Phototoxizität möglich. Durch die Lichtbrechung in unterschiedliche Phasengradienten wird die Bildqualität zusätzlich verbessert, sodass sich auch ohne Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen dynamische Prozesse wie die transendotheliale Leukozytenmigration oder die mikrovaskuläre Thrombusbildung analysieren lassen. Ein Nachteil ist, dass sich die RLOT-Mikroskopie kaum auf andere Modelle übertragen lässt, da sie voraussetzt, dass sich das Untersuchungsobjekt transilluminieren lässt.

### 1.4 Durchflusszytometrie

Zur quantitativen Erhebung der Expression von Oberflächenproteinen auf neutrophilen Granulozyten, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Die Durchflusszytometrie ist ein etabliertes Verfahren zur Quantifizierung und Differenzierung von Zellen bzw. Zellbestandteilen [271]. Zellen werden dabei einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt, wobei das Licht des Laserstrahls abhängig von der Zellgröße gebeugt (Vorwärtsstreulicht, *forward scatter*) und abhängig von der Granularität der Zelle absorbiert bzw. gebrochen (Seitwärtsstreulicht, *sideward scatter*) wird, wodurch sich die Zellen sortieren lassen. Durch den zusätzlichen Einsatz von fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenstrukturen lassen sich einzelne Zellen noch spezifischer charakterisieren. Ein Nachteil ist jedoch, dass sich keine Rückschlüsse auf die genaue Verteilung der Oberflächenstrukturen ziehen lassen. Die Durchflusszytometrie ist sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der klinischen Routine ein anerkanntes Verfahren zur Phänotypisierung von Einzelzellen [272].

## **1.5 Konfokalmikroskopie**

Die Konfokalmikroskopie ist ein etabliertes Verfahren, um Hochkontrast-Aufnahmen zu erstellen [273]. Hierbei wird nicht das ganze Präparat auf einmal beleuchtet, sondern jeweils kurzzeitig nur ein kleiner Teil. Die Aufnahme mehrerer zweidimensionaler Bilder in unterschiedlichen Tiefen in einer Probe ermöglicht dann die Rekonstruktion hochaufgelöster dreidimensionaler Strukturen innerhalb eines Objekts. Der Vorteil der Konfokalmikroskopie liegt darin, mit Hilfe von Fluoreszenz-Markierung alle möglichen Zellen bzw. an diversen Prozessen beteiligte Oberflächenrezeptoren mit präziser örtlicher Auflösung in ihrer physiologischen Umgebung zu visualisieren. Zusammen mit den *in-vivo*-Versuchen lassen sich so Rückschlüsse auf deren Interaktionen ziehen [274]. Nachteile sind in erster Linie die begrenzte Anzahl von Anregungswellenlängen und die lange Aufnahmezeit, da die Bilder abgerastert werden müssen. Zudem schränkt die schädliche Natur der hochintensiven Laserbestrahlung die Aufnahmen von lebenden Organismen ein [275].

## **2 Diskussion der Ergebnisse**

### **2.1 Bedeutung von PAI-1 für die Leukozytenrekrutierung im postischämischen Gewebe**

Da die Leukozytenrekrutierung aus den postkapillären Venolen in das ischämische Gewebe eine zentrale Rolle im IRS einnimmt, wurde zunächst der Einfluss von PAI-1 auf diesen Prozess untersucht. Zu Beginn wurde dessen Verteilung im postischämischen Gewebe nach I/R mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Neben im Blutplasma frei zirkulierendem PAI-1, kann PAI-1 bekanntermaßen an Glykoproteine der Zelloberfläche binden, u.a. VTN, was seine biologische Aktivität erhöht [184-189].

PAI-1 wurde in unseren konfokalmikroskopischen Aufnahmen nach I/R sowohl an Endothelzellen der postkapillären Venolen als auch an infiltrierenden

neutrophilen Granulozyten gefunden, während es in Venolen von scheinoperierten Tieren kaum nachgewiesen wurde, was für eine insgesamt erhöhte postischämische Aktivität von PAI-1 spricht.

In unseren *in-vivo*-Versuchen im Kremastermodell von WT- und PAI-1-defizienten Mäusen, förderte PAI-1 nach I/R die postischämische Adhärenz von neutrophilen Granulozyten am mikrovaskulären Endothel und steigerte die anschließende Transmigration dieser Immunzellen in das umliegende Gewebe. Ein Einfluss auf das intravaskuläre Rollen konnte nicht beobachtet werden. Ähnliche Effekte konnten wir auch nach intraskrotaler Stimulation mit rekombinanten PAI-1 ohne I/R sehen, wo sich ein dosisabhängiger Anstieg der Anzahl fest adhärenter und transmigrierter Leukozyten im Kremastermuskel zeigte, was die wichtige Rolle von PAI-1 in der Leukozytenrekrutierung bestätigt. Diese Ergebnisse erweitern frühere Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe bezüglich der Rolle des fibrinolytischen Systems in der Leukozytenrekrutierung nach I/R. Hier zeigte sich in uPA- und tPA-defizienten Mäusen die postischämische intravaskuläre Adhärenz als auch die Transmigration von Leukozyten im Vergleich zu WT-Tieren signifikant verringert [224, 225]. Zumal PAI-1 als Hauptinhibitor von uPA und tPA aber ebenfalls eine proinflammatorische Rolle im IRS einnimmt, ist davon auszugehen, dass diese Mechanismen unabhängig von den bekannten fibrinolytischen Eigenschaften sind.

## **2.2 Einfluss von leukozytärem und nicht-leukozytärem PAI-1 auf die Leukozytenrekrutierung**

Da wir sowohl *ex vivo* nachweisen konnten, dass PAI-1 nach I/R auf Endothelzellen und auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, als auch *in vitro* die Expression von PAI-1 nach Stimulation mit TNF auf Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten erhöht war, untersuchten wir den Beitrag des leukozytärem PAI-1 im Vergleich zu nicht-leukozytärem PAI-1 für die Rekrutierung von Leukozyten. In Zelltransferversuchen konnten wir zeigen, dass

sowohl das leukozytäre als auch das nicht-leukozytäre PAI-1 die postischämische Extravasation von Leukozyten ab der Ebene der Adhärenz beeinflussen.

### **2.3 Charakterisierung der Mechanismen der PAI-1-abhängigen Extravasation von neutrophilen Granulozyten**

Neben seiner hemmenden Wirkung auf tPA und uPA, interagiert PAI-1 unter anderem mit dem Membranrezeptor LRP-1, einem Mitglied der Familie der *low-density*-Lipoproteinrezeptoren, welche bekanntermaßen als multifunktionale zelluläre Membranrezeptoren in verschiedene biologische Prozesse, einschließlich der Leukozytenrekrutierung, involviert sind [242-244, 276]. Da LRP-1 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, stellten wir die Hypothese auf, dass PAI-1 die postischämische Leukozytenantwort über diesen Rezeptor vermittelt. Die Blockade von LRP-1 führte nach I/R tatsächlich zu einer signifikant verminderten intravaskulären Adhärenz und anschließenden Transmigration von neutrophilen Granulozyten in das postischämische Gewebe des Kremastermuskels und der Leber. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die durch intraskrotal verabreichtes rekombinantes PAI-1-induzierte Leukozytenantwort streng von LRP-1 abhängig war. In diesem Zusammenhang wurden keine Unterschiede zwischen aktivem PAI-1 und latentem PAI-1, ohne antifibrinolytische Aktivität, in Bezug auf die Leukozytenextravasation festgestellt. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass PAI-1 unabhängig von seinen bekannten antifibrinolytischen Eigenschaften Leukozyten rekrutiert.

Um ein umfassenderes, mechanistisches Verständnis dieser Prozesse zu bekommen, wurde in weiteren Experimenten versucht die molekulare Grundlage der PAI-1-abhängigen Reaktion der neutrophilen Granulozyten zu erarbeiten. Die Adhärenz von Leukozyten an mikrovaskuläre Endothelzellen stützt sich bekanntermaßen auf die Interaktion von Leukozyten-Integrinen mit den endothelialen Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und VCAM-1 (Vgl. I/3.3). Dieser Prozess folgt auf eine Konformationsänderung, die typischerweise durch

endothelial präsentierte Chemokine oder andere Entzündungsmediatoren hervorgerufen wird, um die Affinität der membranständigen Leukozytenintegrine zu steigern [141]. Das Ganze wird durch intrazelluläre Signalkaskaden, welche Tyrosin- und MAP-Kinase-abhängig sind vermittelt. Folglich könnte endothelial präsentierte PAI-1 Konformationsänderungen bei den neutrophilen Integrinen auslösen, um so die postischämische Leukozytenrekrutierung zu regulieren. Zu dieser Annahme passend konnten wir mittels Mehrkanal-Durchflusszytometrie-Analysen zeigen, dass PAI-1 eine höhere Affinität der  $\beta$ 2-Integrine in neutrophilen Granulozyten induziert, jedoch keine mikrovaskulären Endothelzellen aktiviert. Des Weiteren wurde durch spezifische Blockade bestimmter Membranproteine und Signaltransduktionwege gezeigt, dass diese Ereignisse LRP-1- und MAPK-gesteuert sind und dass die PAI-1-abhängige Adhärenz von neutrophilen Granulozyten am mikrovaskulären Endothel durch die  $\beta$ 2-Integrine LFA-1/CD11a und Mac-1/CD11b vermittelt werden.

Zusammenfassend deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass endothelial präsentierte PAI-1 als Entzündungsmediator die Rekrutierung rollender neutrophiler Granulozyten in das postischämische Gewebe durch die Interaktion mit LRP-1, was wiederum Konformationsänderungen der  $\beta$ 2-Integrine der neutrophilen Granulozyten über MAPK-abhängige Signalwege induziert, fördert.

### **2.4 Einfluss von PAI-1 auf die mikrovaskuläre Permeabilität**

Die endotheliale Dysfunktion und die dadurch bedingte gesteigerte mikrovaskuläre Permeabilität ist neben der Leukozytenrekrutierung ein weiterer Schlüsselfaktor des IRS [27, 248]. Die beiden Prozesse sind dabei eng miteinander verbunden. Transmigrierende Granulozyten induzieren durch adhäsionsabhängige Prozesse sowie Sekretion von Elastase oder ROS bekanntermaßen die Öffnung endothelialer Kontaktstellen und führen zu Umbauprozessen in der venulären Basalmembran, was zu einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität führt [277]. Angesichts unserer bisherigen Ergebnisse, die den Einfluss von PAI-1 auf die Rekrutierung von Leukozyten nach I/R nachgewiesen haben, stellten wir die Hypothese auf, dass PAI-

1 auch einen Einfluss auf die postischämische Gefäßpermeabilität hat. Studien im Mausmodell haben bereits gezeigt, dass PAI-1 über Modulation der Gefäßpermeabilität, bei der Entstehung der kardialen Fibrose und der ischämischen Hirnschädigung nach Schlaganfall beteiligt ist [278, 279].

Mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie konnten wir zeigen, dass eine PAI-1-Defizienz oder eine Blockade des PAI-1-Rezeptors LRP-1 zu einer verringerten mikrovaskulären Permeabilität nach I/R führt und damit einen potenziell protektiven Effekt auf die postischämische Barrierefunktion hat. Umgekehrt führte die exogene Verabreichung von rekombinantem PAI-1 durch intraskrotale Injektion zu einer signifikanten Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität. Interessanterweise ließ sich *in vivo* die durch PAI-1 hervorgerufene mikrovaskuläre Permeabilitätssteigerung durch die Depletion von neutrophilen Granulozyten wiederum vollständig aufheben. Bei der Stimulation von mikrovaskulären Endothelzellschichten mit rekombinantem PAI-1 *in vitro*, kam es sogar zu einer dosisabhängigen Reduktion der makromolekularen Permeabilität in einer LRP-1-unabhängigen Weise.

Unsere Ergebnisse legen daher nahe, dass PAI-1 die postischämische mikrovaskuläre Permeabilität indirekt durch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten erhöht, jedoch nicht direkt die mikrovaskuläre Integrität beeinträchtigt.

### **2.5 Auswirkung einer PAI-1-Blockade auf die Leukozytenrekrutierung und den Gewebeschaden der Leber nach I/R**

Um diese Erkenntnisse in ein klinisches Setting zu übertragen, wurde die Rolle von PAI-1 im I/R-Modell der Leber analysiert (Vgl. Kap. III/4.1.6). Hier hat der Mangel an PAI-1 zu einer signifikanten Verminderung der Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das postischämische Lebergewebe geführt. Zusätzlich zeigte sich bei PAI-1-defizienten Mäusen eine verringerte Anzahl apoptotischer/nekrotischer Hepatozyten und einer verringerten Serumkonzentration der Transaminasen ALT und AST, was auf einen geringeren IRS schließen lässt. PAI-1 hat, wie wir in weiteren *in-vitro*-Versuchen feststellten, keine direkten zytotoxischen oder zytoprotektiven Wirkungen auf Hepatozyten. Die Ergebnisse legen daher nahe, dass die spezifische



Blockade von PAI-1 in der akuten Entzündungsreaktion nach I/R vor postischämischen Leberschäden durch die Hemmung der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten schützt.

Studien haben jedoch interessanterweise gezeigt, dass es in PAI-1-defizienten Mäuse im experimentellen Myokardinfarkt-Modell zu einer gesteigerten Leukozyteninfiltration des postischämisch Gewebes [228], einer beschleunigten linksventrikulären Dilatation sowie darauffolgenden Myokardruptur [226] und einer verstärkten kardialen Fibrose kommt [227]. In einer weiteren Studie wiederum wurde gezeigt, dass die pharmakologische Hemmung von PAI-1 keine Wirkung auf postischämische Leberschäden oder den kardialen Umbau nach Myokardinfarkt hat [280]. Eine Studie zeigte, im Einklang mit unseren Ergebnissen, dass ein PAI-1-Mangel mit einer reduzierten Gewebeschädigung in der frühen Phase des IRS der Lunge einherging [231]. Ähnliche Ergebnisse zeigte sich beim akuten zerebralen IRS nach der Verabreichung eines gegen PAI-1 und TAFI gerichteten Inhibitors. Die Inhibition führten zu einer Minderung des Hirngewebes Schadens und zu einer Verbesserung der funktionellen Ergebnisse [229, 230]. Aufgrund dieser teils sehr unterschiedlichen Beobachtungen scheint der richtige Zeitpunkt für die Beeinflussung der PAI-1-Wirkung entscheidend für seine erfolgreiche Anwendung bei der Behandlung des IRS zu sein.

### **2.6 Auswirkung eines PAI-1-Mangels auf die mikrovaskuläre Hämostase**

Die Manipulation des fibrinolytischen Systems könnte jedoch nicht nur Wirkungen auf die Leukozytenrekrutierung und damit auf den postischämischen Gewebeschaden, sondern auch auf die Hämostase haben. In machen Studien kam es in Zusammenhang mit einer höheren PAI-1-Aktivität im Vergleich zu PAI-1-defizienten Kontrollgruppe zu einer verstärkten Thrombusbildung [281-285], in anderen Studien kam es in Folge einer hochregulierten Fibrinolyse zu einer verstärkten Blutungsneigung [286]. Solche Nebenwirkungen können wiederum die postischämische Organfunktion beeinträchtigen, wobei eine Studie im Schlaganfallmodell der Maus gezeigt hat, dass eine pharmakologische Blockade von PAI-1 zu profibrinolytischen Effekten führt, ohne dass es zu vermehrten

postischämischen intrakraniellen Blutungen kommt [230]. Eventuelle Blutungsneigungen können möglicherweise nicht nur durch eine Hyperfibrinolyse, sondern auch durch eine Verringerung der Leukozyten-vermittelten prothrombotischen Effekte erklärt werden. Leukozyten sind bekanntermaßen entscheidend an der Thrombusbildung in größeren Gefäßen beteiligt [287, 288] und haben auch in der Mikrovaskulatur im entzündeten Gewebe eine wichtige prothrombotische Funktion, wie unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen konnte [263].

In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass ein Mangel an PAI-1 keinen Einfluss auf die Thrombusbildung in der Mikrovaskulatur oder die Ablagerung von Fibrin(ogen) auf dem postischämischen Endothel hat. Folglich deuten diese Daten darauf hin, dass die medikamentöse Einflussnahme auf PAI-1 im Hinblick auf potenzielle hämostatische Komplikationen eine sichere Strategie zur möglichen Behandlung des IRS im Frühstadium darstellen könnte.

## VI Zusammenfassung

Der IRS ist einer der Hauptmechanismen für die Funktionsstörung und das Versagen von Organen nach Myokardinfarkt, Schlaganfall, hämorrhagischen Schock und Transplantation. Der IRS stellt eine Sonderform der aseptischen Entzündung dar, dessen Schlüsselereignisse die postischämische Akkumulation von Leukozyten in der Mikrovaskulatur und deren Transmigration in das perivaskuläre Gewebe, sowie die Störung der mikrovaskulären Endothelzellintegrität sind, wodurch die ordnungsgemäße Reperfusion beeinträchtigt und die ischämische Gewebeschädigung verstärkt wird.

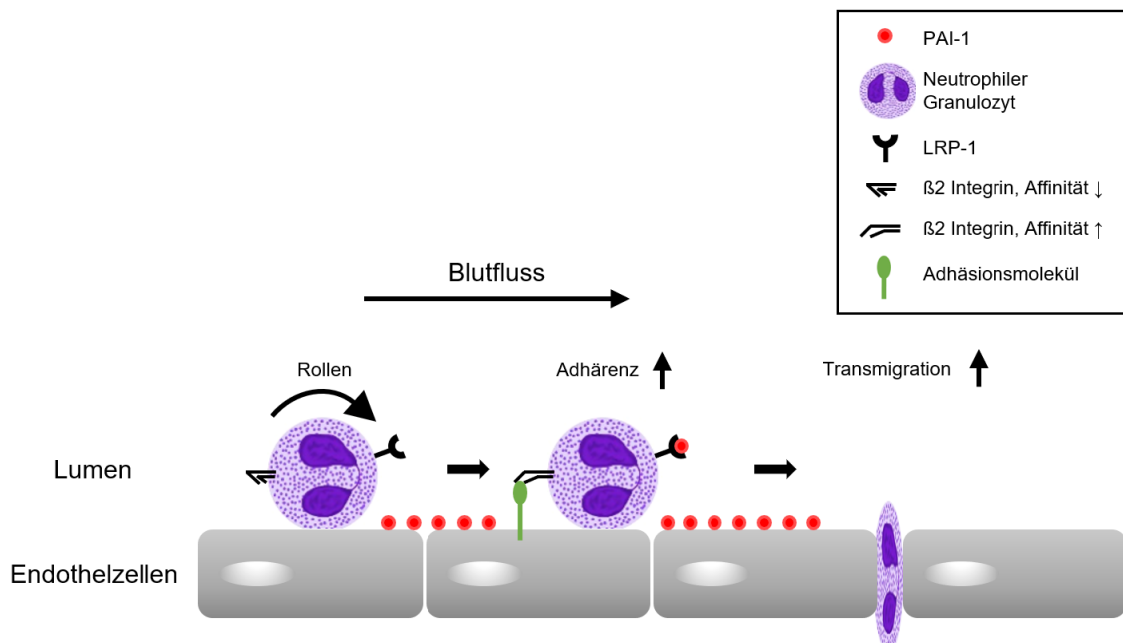
Seit längerem ist bekannt, dass das fibrinolytische System in Entzündungsvorgängen im Körper eng mit dem Immunsystem verbunden ist und sie sich gegenseitig stark beeinflussen. So weiß man auch, dass die verschiedenen Faktoren des fibrinolytischen Systems, u.a. PAI-1, in der Pathogenese des IRS und des darauffolgenden Heilungsprozesses unterschiedlicher Organe involviert sind. Die genaue Rolle von PAI-1 und die zugrunde liegenden Mechanismen waren jedoch bislang nur unzureichend geklärt.

Unter Verwendung verschiedener *in-vivo*-Mikroskopietechniken am Kremastermuskel in WT- und PAI-1-defizienten Mäusen nach I/R, als auch nach intraskrotaler Injektion von rekombinantem PAI-1, wurde die Rolle von PAI-1 in der postischämischen Leukozytenrekrutierung sowie dessen Einfluss auf die mikrovaskuläre Permeabilität untersucht. Um den Mechanismus weiter aufzuschlüsseln wurden zusätzliche Experimente mit spezifischer Antikörperblockade gegen bestimmte Membranproteine durchgeführt und mit Hilfe von Zelltransferexperimenten versucht zwischen dem Einfluss von leukozytärem und nicht-leukozytärem PAI-1 zu differenzieren. Die Verteilung von PAI-1 im postischämischen Gewebe wurde mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Durch Thromboseexperimente wurde zusätzlich die Rolle von PAI-1 in der mikrovaskulären Hämostase untersucht, um daraus Rückschlüsse auf mögliche Nebenwirkungen einer PAI-1-Hemmung zu ziehen.

## Zusammenfassung

Unsere Ergebnisse zeigen zuvor unbekannte, nicht-fibrinolytische Funktionen von PAI-1 als Entzündungsmediator im IRS und geben Einblick in die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen. PAI-1 lagert sich nach I/R am Endothel der postkapillaren Venolen ab und führt dort nach Interaktion mit LRP-1, über MAPK-abhängige Signalwege zur Konformationsänderungen in  $\beta$ 2-Integrinen von intravaskulär rollenden neutrophilen Granulozyten. Daraufhin kommt es zu einer Vermehrten Transmigration der neutrophilen Granulozyten in das postischämische Gewebe. Während dieses Prozesses stören die neutrophilen Granulozyten die endotheliale Integrität und steigern so die mikrovaskuläre Permeabilität. Umgekehrt dämpft eine PAI-1-Defizienz die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und damit die mikrovaskuläre Dysfunktion sowie den darauffolgenden Gewebeschaden bei experimenteller I/R effektiv ab, ohne Nebenwirkungen auf die mikrovaskuläre Hämostase zu zeigen. Diese Erkenntnisse könnten für die Entwicklung vielversprechender neuer Therapiestrategien zur Vorbeugung und Behandlung des IRS genutzt werden.

Die Ergebnisse dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden in *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* veröffentlicht [289].



**Abbildung 32: Schematische Darstellung der Mechanismen der PAI-1-induzierten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das perivaskuläre Gewebe bei I/R.**

## VII Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
$\alpha$ 2AP	$\alpha$ 2-Antiplasmin
$\alpha$ 2M	$\alpha$ 2-Makroglobulin
<i>A. femoralis</i>	<i>Arteria femoralis</i>
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Allophycocyanin
AST	Aspartat-Aminotransferase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fi	<i>fraction of inspired oxygen</i> , inspiratorische Sauerstofffraktion
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm
G	Gauche
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GP	Glykoprotein
h	Stunden
HMEC	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen
i. a.	intraarteriell
i. p.	intraperitoneal
i. s.	intraskrotal
i. v.	intravenös
I/R	Ischämie-Reperfusion
IRS	Ischämie-Reperfusionsschaden

## Abkürzungsverzeichnis

ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
ICAM-2	<i>intercellular adhesion molecule-2</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRS	Ischämie-Reperfusionsschaden
IVM	Intravitalmikroskopie
JAMs	<i>junctional adhesion molecules</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
kDA	Kilodalton
KG	Körpergewicht
L	Liter
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LP	Langpass-Filter
LRP-1	<i>low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
LTB4	Leukotrien B4
Ly6G	<i>lymphocyte antigen 6G</i>
<i>M. cremaster</i>	<i>Musculus cremaster</i>
MAC-1	<i>macrophage-1 antigen</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität/Grauwerte
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
MW	Mittelwert
N <sub>2</sub> O	Distickstoffoxid
n	Stoffmenge
NA	numerische Apertur
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NET	<i>neutrophil extracellular traps</i>

## Abkürzungsverzeichnis

NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
Nm	Nanometer
p	Signifikanzwert
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PAI-1	Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1
PAI-1 <sup>-/-</sup>	PAI-1-defizienz
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RAP	rezeptor-assoziiertes Protein
RLOT	<i>reflected light oblique transillumination</i>
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunde
SEM	<i>standard error of mean</i>
SSC	<i>side scatter</i>
SYK	<i>spleen tyrosin kinase</i>
TAFI	Thrombin-aktivierbare Fibrinolyse-Inhibitor
TNF	Tumornekrosefaktor
tPA	<i>Tissue plasminogen activator</i> , gewebespezifischer Plasminogenaktivator
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-digoxenin nick-end labeling</i>
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator, Urokinase
uPAR	<i>urokinase-type plasminogen activator receptor</i>
VCAM-1	<i>vascular cellular adhesion molecule-1</i>
VLA-4	<i>very late antigen-4</i>
VTN	Vitronektin
WT	Wildtyp
vWF	Von-Willebrand-Faktor

## Abkürzungsverzeichnis

$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{mol}$	Mikormol



## VIII Literaturverzeichnis

1. Medzhitov, R., *Inflammation 2010: new adventures of an old flame*. Cell, 2010. **140**(6): p. 771-6.
2. Ryan, G.B. and G. Majno, *Acute inflammation. A review*. Am J Pathol, 1977. **86**(1): p. 183-276.
3. Libby, P. and S.K. Clinton, *Cytokines as mediators of vascular pathology*. Nouv Rev Fr Hematol, 1992. **34 Suppl**: p. S47-53.
4. Libby, P., et al., *Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells*. Am J Pathol, 1986. **124**(2): p. 179-85.
5. Poole, J.C. and H.W. Florey, *Changes in the endothelium of the aorta and the behaviour of macrophages in experimental atheroma of rabbits*. J Pathol Bacteriol, 1958. **75**(2): p. 245-51.
6. Stemme, S., et al., *T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 3893-7.
7. Cush, J.J. and P.E. Lipsky, *Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(10): p. 1230-8.
8. Feldmann, M., F.M. Brennan, and R.N. Maini, *Rheumatoid arthritis*. Cell, 1996. **85**(3): p. 307-10.
9. Feldmann, M., F.M. Brennan, and R.N. Maini, *Role of cytokines in rheumatoid arthritis*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 397-440.
10. Janosy, G., et al., *Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation*. Lancet, 1981. **2**(8251): p. 839-42.
11. Todd, J.A., et al., *A molecular basis for MHC class II--associated autoimmunity*. Science, 1988. **240**(4855): p. 1003-9.
12. Baumgart, D.C. and W.J. Sandborn, *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies*. Lancet, 2007. **369**(9573): p. 1641-57.

13. Engel, C., et al., *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. Intensive Care Med, 2007. **33**(4): p. 606-18.
14. Martin, G.S., et al., *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000*. N Engl J Med, 2003. **348**(16): p. 1546-54.
15. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. Jama, 2016. **315**(8): p. 801-10.
16. Eltzschig, H.K. and T. Eckle, *Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation*. Nature Medicine, 2011. **17**(11): p. 1391-1401.
17. Kalogeris, T., et al., *Cell biology of ischemia/reperfusion injury*. Int Rev Cell Mol Biol, 2012. **298**: p. 229-317.
18. Nayler, W.G., *Calcium and cell death*. Eur Heart J, 1983. **4 Suppl C**: p. 33-41.
19. Nayler, W.G. and J.S. Elz, *Reperfusion injury: laboratory artifact or clinical dilemma?* Circulation, 1986. **74**(2): p. 215-21.
20. Menger, M.D., et al., *Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox"*. Am J Physiol, 1992. **263**(6 Pt 2): p. H1901-6.
21. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
22. Formigli, L., et al., *Are macrophages involved in early myocardial reperfusion injury?* Ann Thorac Surg, 2001. **71**(5): p. 1596-602.
23. Kumar, P., et al., *Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation*. Expert Rev Mol Med, 2009. **11**: p. e19.
24. Li, L. and M.D. Okusa, *Macrophages, dendritic cells, and kidney ischemia-reperfusion injury*. Semin Nephrol, 2010. **30**(3): p. 268-77.
25. Metz, M. and M. Maurer, *Mast cells--key effector cells in immune responses*. Trends Immunol, 2007. **28**(5): p. 234-41.
26. Khandoga, A., et al., *Platelet adhesion mediated by fibrinogen-intercellular adhesion molecule-1 binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo*. Transplantation, 2002. **74**(5): p. 681-8.
27. Schofield, Z.V., et al., *Neutrophils--a key component of ischemia-reperfusion injury*. Shock, 2013. **40**(6): p. 463-70.

28. Gute, D.C., et al., *Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle*. Mol Cell Biochem, 1998. **179**(1-2): p. 169-87.
29. Rezkalla, S.H. and R.A. Kloner, *No-reflow phenomenon*. Circulation, 2002. **105**(5): p. 656-62.
30. Granger, D.N., *Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol, 1988. **255**(6 Pt 2): p. H1269-75.
31. Granger, D.N., *Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease*. Microcirculation, 1999. **6**(3): p. 167-78.
32. Kvietys, P.R. and D.N. Granger, *Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(3): p. 556-592.
33. Raedschelders, K., D.M. Ansley, and D.D. Chen, *The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion*. Pharmacol Ther, 2012. **133**(2): p. 230-55.
34. Rodrigues, S.F. and D.N. Granger, *Role of blood cells in ischaemia-reperfusion induced endothelial barrier failure*. Cardiovasc Res, 2010. **87**(2): p. 291-9.
35. Murphy, K., *Janeway's Immunobiology*. 9 ed. 2016, New York: Garland Science.
36. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(1): p. 37-49.
37. Pillay, J., et al., *In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2010. **116**(4): p. 625-7.
38. Nauseef, W.M. and N. Borregaard, *Neutrophils at work*. Nat Immunol, 2014. **15**(7): p. 602-11.
39. De Filippo, K., et al., *Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation*. Blood, 2013. **121**(24): p. 4930-7.
40. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
41. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.

42. Marki, A., et al., *Role of the endothelial surface layer in neutrophil recruitment*. J Leukoc Biol, 2015. **98**(4): p. 503-15.
43. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. Immunity, 2010. **33**(5): p. 657-70.
44. Hager, M., J.B. Cowland, and N. Borregaard, *Neutrophil granules in health and disease*. J Intern Med, 2010. **268**(1): p. 25-34.
45. Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing*. Blood, 1998. **92**(9): p. 3007-17.
46. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
47. Papayannopoulos, V. and A. Zychlinsky, *NETs: a new strategy for using old weapons*. Trends Immunol, 2009. **30**(11): p. 513-21.
48. Phillipson, M. and P. Kubes, *The neutrophil in vascular inflammation*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1381-90.
49. Yipp, B.G., et al., *Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo*. Nat Med, 2012. **18**(9): p. 1386-93.
50. Döring, Y., O. Soehnlein, and C. Weber, *Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis*. Circ Res, 2017. **120**(4): p. 736-743.
51. Blanchard, C. and M.E. Rothenberg, *Biology of the eosinophil*. Adv Immunol, 2009. **101**: p. 81-121.
52. Ravin, K.A. and M. Loy, *The Eosinophil in Infection*. Clin Rev Allergy Immunol, 2016. **50**(2): p. 214-27.
53. Leiferman, K.M., *Eosinophils in atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 1994. **94**(6 Pt 2): p. 1310-7.
54. McBrien, C.N. and A. Menzies-Gow, *The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma*. Front Med (Lausanne), 2017. **4**: p. 93.
55. Dvorak, A.M., *Basophils and mast cells: piecemeal degranulation in situ and ex vivo: a possible mechanism for cytokine-induced function in disease*. Immunol Ser, 1992. **57**: p. 169-271.
56. Galli, S.J., J.R. Gordon, and B.K. Wershil, *Cytokine production by mast cells and basophils*. Curr Opin Immunol, 1991. **3**(6): p. 865-72.

57. Auffray, C., et al., *Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior*. Science, 2007. **317**(5838): p. 666-70.
58. Yang, J., et al., *Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases*. Biomark Res, 2014. **2**(1): p. 1.
59. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood, 2010. **116**(16): p. e74-80.
60. Lysakova-Devine, T. and C. O'Farrelly, *Tissue-specific NK cell populations and their origin*. J Leukoc Biol, 2014. **96**(6): p. 981-90.
61. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
62. Vankayalapati, R., et al., *NK cells regulate CD8+ T cell effector function in response to an intracellular pathogen*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 130-7.
63. Reitamo, S., et al., *Human lysozyme (origin and distribution in health and disease)*. Ric Clin Lab, 1978. **8**(4): p. 211-31.
64. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 610-21.
65. Dinarello, C.A., *Proinflammatory cytokines*. Chest, 2000. **118**(2): p. 503-8.
66. Kany, S., J.T. Vollrath, and B. Relja, *Cytokines in Inflammatory Disease*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(23).
67. Bohana-Kashtan, O., et al., *Cell signals transduced by complement*. Mol Immunol, 2004. **41**(6-7): p. 583-97.
68. Diebolder, C.A., et al., *Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface*. Science, 2014. **343**(6176): p. 1260-3.
69. Bavia, L., et al., *Complement activation in acute myocardial infarction: An early marker of inflammation and tissue injury?* Immunol Lett, 2018. **200**: p. 18-25.
70. Ghosh, P., et al., *Role of complement and complement regulatory proteins in the complications of diabetes*. Endocr Rev, 2015. **36**(3): p. 272-88.

71. Ilczuk, T., et al., *Possible role of complement factors and their inhibitors in the myocardial infarction: an immunohistochemical study*. Cent Eur J Immunol, 2014. **39**(2): p. 253-9.
72. Walport, M.J., *Complement and systemic lupus erythematosus*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S279-93.
73. Jordan, J.E., Z.Q. Zhao, and J. Vinten-Johansen, *The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(4): p. 860-78.
74. Oliveira, T.H.C., et al., *Neutrophils: a cornerstone of liver ischemia and reperfusion injury*. Lab Invest, 2018. **98**(1): p. 51-62.
75. Carden, D.L. and D.N. Granger, *Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury*. J Pathol, 2000. **190**(3): p. 255-66.
76. Li, L., et al., *IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 331-42.
77. Kubes, P., M. Jutila, and D. Payne, *Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion*. J Clin Invest, 1995. **95**(6): p. 2510-9.
78. Linas, S.L., et al., *Ischemia increases neutrophil retention and worsens acute renal failure: role of oxygen metabolites and ICAM 1*. Kidney Int, 1995. **48**(5): p. 1584-91.
79. Paller, M.S., *Effect of neutrophil depletion on ischemic renal injury in the rat*. J Lab Clin Med, 1989. **113**(3): p. 379-86.
80. Thornton, M.A., et al., *An evaluation of the neutrophil as a mediator of in vivo renal ischemic-reperfusion injury*. Am J Pathol, 1989. **135**(3): p. 509-15.
81. Yago, T., et al., *Blocking neutrophil integrin activation prevents ischemia-reperfusion injury*. J Exp Med, 2015. **212**(8): p. 1267-81.
82. Rios-Navarro, C., et al., *Characterization and implications of the dynamics of eosinophils in blood and in the infarcted myocardium after coronary reperfusion*. PLoS One, 2018. **13**(10): p. e0206344.

83. Rotting, A.K., et al., *Effects of ischemia and reperfusion on eosinophilic accumulation and distribution in mucosa of equine jejunum and colon*. Am J Vet Res, 2016. **77**(5): p. 534-9.
84. Ingersoll, M.A., et al., *Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation*. Trends Immunol, 2011. **32**(10): p. 470-7.
85. Maekawa, Y., et al., *Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction:a possible role for left ventricular remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(2): p. 241-6.
86. Arumugam, T.V., et al., *The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury*. Shock, 2004. **21**(5): p. 401-9.
87. Dong, J., et al., *Strategies for targeting complement inhibitors in ischaemia/reperfusion injury*. Mol Immunol, 1999. **36**(13-14): p. 957-63.
88. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immune recognition and control of adaptive immune responses*. Semin Immunol, 1998. **10**(5): p. 351-3.
89. Pennock, N.D., et al., *T cell responses: naive to memory and everything in between*. Adv Physiol Educ, 2013. **37**(4): p. 273-83.
90. Appay, V., et al., *Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues*. Cytometry A, 2008. **73**(11): p. 975-83.
91. Peterson, R.A., *Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression*. Toxicol Pathol, 2012. **40**(2): p. 186-204.
92. Hivroz, C., et al., *Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells*. Crit Rev Immunol, 2012. **32**(2): p. 139-55.
93. Andersen, M.H., et al., *Cytotoxic T cells*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(1): p. 32-41.
94. Kam, C.M., D. Hudig, and J.C. Powers, *Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1477**(1-2): p. 307-23.
95. LeBien, T.W. and T.F. Tedder, *B lymphocytes: how they develop and function*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1570-80.
96. Ollila, J. and M. Vihinen, *B cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(3): p. 518-23.

97. Burne-Taney, M.J., et al., *B cell deficiency confers protection from renal ischemia reperfusion injury*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3210-5.
98. Chen, J., et al., *B cells contribute to ischemia/reperfusion-mediated tissue injury*. J Autoimmun, 2009. **32**(3-4): p. 195-200.
99. Renner, B., et al., *B cell subsets contribute to renal injury and renal protection after ischemia/reperfusion*. J Immunol, 2010. **185**(7): p. 4393-400.
100. Tsokos, G.C., *B cells, be gone--B-cell depletion in the treatment of rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2004. **350**(25): p. 2546-8.
101. Burne, M.J., et al., *Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure*. J Clin Invest, 2001. **108**(9): p. 1283-90.
102. Rabb, H., et al., *Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **279**(3): p. F525-31.
103. Yilmaz, G., et al., *Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke*. Circulation, 2006. **113**(17): p. 2105-12.
104. Day, Y.J., et al., *Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: the role of CD4+ T cells and IFN-gamma*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 3108-14.
105. Gandolfo, M.T., et al., *Foxp3+ regulatory T cells participate in repair of ischemic acute kidney injury*. Kidney Int, 2009. **76**(7): p. 717-29.
106. Gandolfo, M.T., et al., *Mycophenolate mofetil modifies kidney tubular injury and Foxp3+ regulatory T cell trafficking during recovery from experimental ischemia-reperfusion*. Transpl Immunol, 2010. **23**(1-2): p. 45-52.
107. Huang, Y., H. Rabb, and K.L. Womer, *Ischemia-reperfusion and immediate T cell responses*. Cell Immunol, 2007. **248**(1): p. 4-11.
108. Yilmaz, G. and D.N. Granger, *Leukocyte recruitment and ischemic brain injury*. Neuromolecular Med, 2010. **12**(2): p. 193-204.
109. Stabile, E., et al., *Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice*. Circulation, 2003. **108**(2): p. 205-10.



110. Burne-Taney, M.J., N. Yokota-Ikeda, and H. Rabb, *Effects of combined T- and B-cell deficiency on murine ischemia reperfusion injury*. Am J Transplant, 2005. **5**(6): p. 1186-93.
111. Brait, V.H., et al., *Importance of T lymphocytes in brain injury, immunodeficiency, and recovery after cerebral ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2012. **32**(4): p. 598-611.
112. Caldwell, C.C., J. Tschoep, and A.B. Lentsch, *Lymphocyte function during hepatic ischemia/reperfusion injury*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(3): p. 457-64.
113. Linfert, D., T. Chowdhry, and H. Rabb, *Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury*. Transplant Rev (Orlando), 2009. **23**(1): p. 1-10.
114. Sadik, C.D., N.D. Kim, and A.D. Luster, *Neutrophils cascading their way to inflammation*. Trends Immunol, 2011. **32**(10): p. 452-60.
115. Kansas, G.S., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3259-87.
116. Alon, R., D.A. Hammer, and T.A. Springer, *Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow*. Nature, 1995. **374**(6522): p. 539-42.
117. Zarbock, A., et al., *Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow*. Blood, 2011. **118**(26): p. 6743-51.
118. Bargatze, R.F., et al., *Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1785-92.
119. Eriksson, E.E., et al., *Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo*. J Exp Med, 2001. **194**(2): p. 205-18.
120. Abbal, C., et al., *Lipid raft adhesion receptors and Syk regulate selectin-dependent rolling under flow conditions*. Blood, 2006. **108**(10): p. 3352-9.
121. Chan, J.R., S.J. Hyduk, and M.I. Cybulsky, *Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration*. J Exp Med, 2001. **193**(10): p. 1149-58.

122. Laudanna, C., et al., *Rapid leukocyte integrin activation by chemokines*. Immunol Rev, 2002. **186**: p. 37-46.
123. Simon, S.I., et al., *Neutrophil tethering on E-selectin activates beta 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway*. J Immunol, 2000. **164**(8): p. 4348-58.
124. Urzainqui, A., et al., *ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1*. Immunity, 2002. **17**(4): p. 401-12.
125. Zarbock, A., C.A. Lowell, and K. Ley, *Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1*. Immunity, 2007. **26**(6): p. 773-83.
126. Frommhold, D., et al., *Spleen tyrosine kinase Syk is critical for sustained leukocyte adhesion during inflammation in vivo*. BMC Immunol, 2007. **8**: p. 31.
127. Schymeinsky, J., et al., *The Vav binding site of the non-receptor tyrosine kinase Syk at Tyr 348 is critical for beta2 integrin (CD11/CD18)-mediated neutrophil migration*. Blood, 2006. **108**(12): p. 3919-27.
128. Willeke, T., et al., *A role for Syk-kinase in the control of the binding cycle of the beta2 integrins (CD11/CD18) in human polymorphonuclear neutrophils*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(2): p. 260-9.
129. Crijns, H., V. Vanheule, and P. Proost, *Targeting Chemokine-Glycosaminoglycan Interactions to Inhibit Inflammation*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 483.
130. Handel, T.M., et al., *Regulation of protein function by glycosaminoglycans-as exemplified by chemokines*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 385-410.
131. Herndon, M.E., C.S. Stipp, and A.D. Lander, *Interactions of neural glycosaminoglycans and proteoglycans with protein ligands: assessment of selectivity, heterogeneity and the participation of core proteins in binding*. Glycobiology, 1999. **9**(2): p. 143-55.
132. Johnson, Z., A.E. Proudfoot, and T.M. Handel, *Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(6): p. 625-36.

133. Pruenster, M. and A. Rot, *Throwing light on DARC*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 6): p. 1005-8.
134. Barreiro, O., et al., *Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes*. J Cell Biol, 2002. **157**(7): p. 1233-45.
135. Berlin, C., et al., *alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow*. Cell, 1995. **80**(3): p. 413-22.
136. Constantin, G., et al., *Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow*. Immunity, 2000. **13**(6): p. 759-69.
137. Hyun, Y.M. and C.W. Hong, *Deep insight into neutrophil trafficking in various organs*. J Leukoc Biol, 2017. **102**(3): p. 617-629.
138. Sumagin, R., et al., *LFA-1 and Mac-1 define characteristically different intraluminal crawling and emigration patterns for monocytes and neutrophils in situ*. J Immunol, 2010. **185**(11): p. 7057-66.
139. Jenne, C.N., et al., *Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps*. Cell Host Microbe, 2013. **13**(2): p. 169-80.
140. Phillipson, M., et al., *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2569-75.
141. Vestweber, D., *How leukocytes cross the vascular endothelium*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(11): p. 692-704.
142. Cinamon, G., et al., *Chemoattractant signals and beta 2 integrin occupancy at apical endothelial contacts combine with shear stress signals to promote transendothelial neutrophil migration*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7282-91.
143. Burns, A.R., et al., *Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration*. J Cell Sci, 2000. **113 ( Pt 1)**: p. 45-57.
144. Nourshargh, S., S.A. Renshaw, and B.A. Imhof, *Reverse Migration of Neutrophils: Where, When, How, and Why?* Trends Immunol, 2016. **37**(5): p. 273-286.

145. Petri, B., M. Phillipson, and P. Kubes, *The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6439-46.
146. Woodfin, A., et al., *The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 761-9.
147. Voisin, M.B. and S. Nourshargh, *Neutrophil transmigration: emergence of an adhesive cascade within venular walls*. J Innate Immun, 2013. **5**(4): p. 336-47.
148. Millan, J. and A.J. Ridley, *Rho GTPases and leucocyte-induced endothelial remodelling*. Biochem J, 2005. **385**(Pt 2): p. 329-37.
149. Borregaard, N. and J.B. Cowland, *Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte*. Blood, 1997. **89**(10): p. 3503-21.
150. Kolaczowska, E., et al., *Neutrophil elastase activity compensates for a genetic lack of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in leukocyte infiltration in a model of experimental peritonitis*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(3): p. 374-81.
151. Pham, C.T., *Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 541-50.
152. Hirschi, K.K. and P.A. D'Amore, *Pericytes in the microvasculature*. Cardiovasc Res, 1996. **32**(4): p. 687-98.
153. Stark, K., et al., *Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs*. Nat Immunol, 2013. **14**(1): p. 41-51.
154. Stark, K., K. Pekayvaz, and S. Massberg, *Role of pericytes in vascular immunosurveillance*. Front Biosci (Landmark Ed), 2018. **23**: p. 767-781.
155. Nourshargh, S., P.L. Hordijk, and M. Sixt, *Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(5): p. 366-78.
156. Proebstl, D., et al., *Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo*. J Exp Med, 2012. **209**(6): p. 1219-34.
157. Rodvien, R. and C.H. Mielke, Jr., *Role of platelets in hemostasis and thrombosis*. West J Med, 1976. **125**(3): p. 181-6.

158. Mackman, N., *Triggers, targets and treatments for thrombosis*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 914-8.
159. Dahlbäck, B., *Blood coagulation*. Lancet, 2000. **355**(9215): p. 1627-32.
160. Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of thrombus formation*. N Engl J Med, 2008. **359**(9): p. 938-49.
161. Mann, K.G. and L. Lorand, *Introduction: blood coagulation*. Methods Enzymol, 1993. **222**: p. 1-10.
162. Engelmann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 34-45.
163. Pfeiler, S., S. Massberg, and B. Engelmann, *Biological basis and pathological relevance of microvascular thrombosis*. Thromb Res, 2014. **133 Suppl 1**: p. S35-7.
164. Hickey, M.J. and P. Kubes, *Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 364-75.
165. Palabrica, T., et al., *Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets*. Nature, 1992. **359**(6398): p. 848-51.
166. Semple, J.W., J.E. Italiano, Jr., and J. Freedman, *Platelets and the immune continuum*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(4): p. 264-74.
167. Pfeiler, S., et al., *Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks*. Haematologica, 2017. **102**(2): p. 206-213.
168. Yousefi, S., et al., *Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense*. Nat Med, 2008. **14**(9): p. 949-53.
169. McDonald, B., et al., *Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(3): p. 324-33.
170. Massberg, S., et al., *Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases*. Nat Med, 2010. **16**(8): p. 887-96.

171. Downing, L.J., et al., *Anti-P-selectin antibody decreases inflammation and thrombus formation in venous thrombosis*. J Vasc Surg, 1997. **25**(5): p. 816-27; discussion 828.
172. von Brühl, M.L., et al., *Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo*. J Exp Med, 2012. **209**(4): p. 819-35.
173. Martinod, K., et al., *Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis*. J Thromb Haemost, 2016. **14**(3): p. 551-8.
174. Marx, C., et al., *Eosinophil-platelet interactions promote atherosclerosis and stabilize thrombosis with eosinophil extracellular traps*. Blood, 2019. **134**(21): p. 1859-1872.
175. Kane, K.K., *Fibrinolysis--a review*. Ann Clin Lab Sci, 1984. **14**(6): p. 443-9.
176. Cesarman-Maus, G. and K.A. Hajjar, *Molecular mechanisms of fibrinolysis*. Br J Haematol, 2005. **129**(3): p. 307-21.
177. Ponting, C.P., J.M. Marshall, and S.A. Cederholm-Williams, *Plasminogen: a structural review*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1992. **3**(5): p. 605-14.
178. Declerck, P.J. and A. Gils, *Three decades of research on plasminogen activator inhibitor-1: a multifaceted serpin*. Semin Thromb Hemost, 2013. **39**(4): p. 356-64.
179. Keijer, J., et al., *The interaction of plasminogen activator inhibitor 1 with plasminogen activators (tissue-type and urokinase-type) and fibrin: localization of interaction sites and physiologic relevance*. Blood, 1991. **78**(2): p. 401-9.
180. Handt, S., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 secretion of endothelial cells increases fibrinolytic resistance of an in vitro fibrin clot: evidence for a key role of endothelial cells in thrombolytic resistance*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4204-13.
181. Kruithof, E.K., C. Tran-Thang, and F. Bachmann, *Studies on the release of a plasminogen activator inhibitor by human platelets*. Thromb Haemost, 1986. **55**(2): p. 201-5.

182. Hekman, C.M. and D.J. Loskutoff, *Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators that can be activated by denaturants*. J Biol Chem, 1985. **260**(21): p. 11581-7.
183. Mottonen, J., et al., *Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1*. Nature, 1992. **355**(6357): p. 270-3.
184. Gebbink, R.K., et al., *Specific glycosaminoglycans support the inhibition of thrombin by plasminogen activator inhibitor 1*. Biochemistry, 1993. **32**(6): p. 1675-80.
185. Lawrence, D.A., et al., *Characterization of the binding of different conformational forms of plasminogen activator inhibitor-1 to vitronectin. Implications for the regulation of pericellular proteolysis*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7676-80.
186. Owensby, D.A., et al., *Binding of plasminogen activator inhibitor type-1 to extracellular matrix of Hep G2 cells. Evidence that the binding protein is vitronectin*. J Biol Chem, 1991. **266**(7): p. 4334-40.
187. Preissner, K.T., et al., *Structural requirements for the extracellular interaction of plasminogen activator inhibitor 1 with endothelial cell matrix-associated vitronectin*. J Biol Chem, 1990. **265**(30): p. 18490-8.
188. Seiffert, D., et al., *Interactions between type 1 plasminogen activator inhibitor, extracellular matrix and vitronectin*. Cell Differ Dev, 1990. **32**(3): p. 287-92.
189. Zhou, A., et al., *How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(7): p. 541-4.
190. Aoki, N., M. Moroi, and K. Tachiya, *Effects of alpha2-plasmin inhibitor on fibrin clot lysis. Its comparison with alpha2-macroglobulin*. Thromb Haemost, 1978. **39**(1): p. 22-31.
191. Foley, J.H., et al., *Insights into thrombin activatable fibrinolysis inhibitor function and regulation*. J Thromb Haemost, 2013. **11 Suppl 1**: p. 306-15.
192. Holmes, W.E., et al., *Primary structure of human alpha 2-antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin)*. J Biol Chem, 1987. **262**(4): p. 1659-64.
193. Degen, J.L., T.H. Bugge, and J.D. Goguen, *Fibrin and fibrinolysis in infection and host defense*. J Thromb Haemost, 2007. **5 Suppl 1**: p. 24-31.

194. Hajjar, K.A. and A. Deora, *New concepts in fibrinolysis and angiogenesis*. Curr Atheroscler Rep, 2000. **2**(5): p. 417-21.
195. Kwaan, H.C. and P.F. Lindholm, *Fibrin and Fibrinolysis in Cancer*. Semin Thromb Hemost, 2019. **45**(4): p. 413-422.
196. Syrovets, T., O. Lunov, and T. Simmet, *Plasmin as a proinflammatory cell activator*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(3): p. 509-19.
197. Grabowska, M.M. and M.L. Day, *Soluble E-cadherin: more than a symptom of disease*. Front Biosci (Landmark Ed), 2012. **17**: p. 1948-64.
198. Reichel, C.A., et al., *Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(4): p. 864-74.
199. Ito, A., et al., *Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1996. **271**(25): p. 14657-60.
200. Johnson, L.L., R. Dyer, and D.J. Hupe, *Matrix metalloproteinases*. Curr Opin Chem Biol, 1998. **2**(4): p. 466-71.
201. Schonbeck, U., F. Mach, and P. Libby, *Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3340-6.
202. Scorilas, A., et al., *Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients*. Br J Cancer, 2001. **84**(11): p. 1488-96.
203. Yu, Q. and I. Stamenkovic, *Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis*. Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 163-76.
204. Amara, U., et al., *Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems*. J Immunol, 2010. **185**(9): p. 5628-36.
205. Mortier, A., et al., *Biological activity of CXCL8 forms generated by alternative cleavage of the signal peptide or by aminopeptidase-mediated truncation*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23913.
206. Heissig, B., et al., *Contribution of the fibrinolytic pathway to hematopoietic regeneration*. J Cell Physiol, 2009. **221**(3): p. 521-5.



207. Kwaan, H.C., A.P. Mazar, and B.J. McMahon, *The apparent uPA/PAI-1 paradox in cancer: more than meets the eye*. Semin Thromb Hemost, 2013. **39**(4): p. 382-91.
208. Look, M.P., et al., *Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(2): p. 116-28.
209. McMahon, G.A., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 33964-8.
210. Stefansson, S., et al., *Inhibition of angiogenesis in vivo by plasminogen activator inhibitor-1*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 8135-41.
211. Cao, C., et al., *Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration*. Embo j, 2006. **25**(9): p. 1860-70.
212. Boyle, M.D., et al., *Urokinase: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo*. J Immunol, 1987. **139**(1): p. 169-74.
213. Del Rosso, M., et al., *The urokinase receptor system, a key regulator at the intersection between inflammation, immunity, and coagulation*. Curr Pharm Des, 2011. **17**(19): p. 1924-43.
214. Mauro, C.D., et al., *Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression enhances invasion and metastasis in RAS mutated tumors*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 9388.
215. May, A.E., et al., *Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via beta 2 integrins in vivo*. J Exp Med, 1998. **188**(6): p. 1029-37.
216. Smith, H.W. and C.J. Marshall, *Regulation of cell signalling by uPAR*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(1): p. 23-36.
217. Medcalf, R.L., *Fibrinolysis, inflammation, and regulation of the plasminogen activating system*. J Thromb Haemost, 2007. **5 Suppl 1**: p. 132-42.
218. Pfefferkorn, T., et al., *Plasminogen activation in focal cerebral ischemia and reperfusion*. J Cereb Blood Flow Metab, 2000. **20**(2): p. 337-42.
219. Edagawa, M., et al., *Reduction of post-ischemic lung reperfusion injury by fibrinolytic activity suppression*. Transplantation, 1999. **67**(7): p. 944-9.

220. Buerke, M., et al., *Effects of aprotinin on gene expression and protein synthesis after ischemia and reperfusion in rats*. Circulation, 2007. **116**(11 Suppl): p. I121-6.
221. Reichel, C.A., et al., *Plasmin inhibitors prevent leukocyte accumulation and remodeling events in the postischemic microvasculature*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17229.
222. Roelofs, J.J., et al., *Tissue-type plasminogen activator modulates inflammatory responses and renal function in ischemia reperfusion injury*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(1): p. 131-40.
223. Zhao, Y., et al., *Depletion of tissue plasminogen activator attenuates lung ischemia-reperfusion injury via inhibition of neutrophil extravasation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **300**(5): p. L718-29.
224. Uhl, B., et al., *Tissue plasminogen activator promotes postischemic neutrophil recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(7): p. 1495-504.
225. Reichel, C.A., et al., *Urokinase-type plasminogen activator promotes paracellular transmigration of neutrophils via Mac-1, but independently of urokinase-type plasminogen activator receptor*. Circulation, 2011. **124**(17): p. 1848-59.
226. Askari, A.T., et al., *Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction*. J Exp Med, 2003. **197**(5): p. 615-24.
227. Moriwaki, H., et al., *Overexpression of urokinase by macrophages or deficiency of plasminogen activator inhibitor type 1 causes cardiac fibrosis in mice*. Circ Res, 2004. **95**(6): p. 637-44.
228. Zaman, A.K., et al., *Deleterious effects of lack of cardiac PAI-1 after coronary occlusion in mice and their pathophysiologic determinants*. Histochem Cell Biol, 2007. **128**(2): p. 135-45.
229. Denorme, F., et al., *Inhibition of Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Reduces Ischemic Brain Damage in Mice*. Stroke, 2016. **47**(9): p. 2419-22.

- 230. Wyseure, T., et al., *Innovative thrombolytic strategy using a heterodimer diabody against TAFI and PAI-1 in mouse models of thrombosis and stroke*. Blood, 2015. **125**(8): p. 1325-32.
- 231. Lau, C.L., et al., *Enhanced fibrinolysis protects against lung ischemia-reperfusion injury*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **137**(5): p. 1241-8.
- 232. Okada, K., et al., *Potentiation of endogenous fibrinolysis and rescue from lung ischemia/reperfusion injury in interleukin (IL)-10-reconstituted IL-10 null mice*. J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21468-76.
- 233. Carmeliet, P., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. I. Generation by homologous recombination and characterization*. J Clin Invest, 1993. **92**(6): p. 2746-55.
- 234. Baez, S., *An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy*. Microvasc Res, 1973. **5**(3): p. 384-94.
- 235. Baez, S. and L.R. Orkin, *Microcirculatory reactions to 'chemical denervation' in striated muscle*. Bibl Anat, 1967. **9**: p. 61-5.
- 236. Biberthaler, P., et al., *The influence of organ temperature on hepatic ischemia-reperfusion injury: a systematic analysis*. Transplantation, 2001. **72**(9): p. 1486-90.
- 237. Woodfin, A., et al., *JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration*. Blood, 2007. **110**(6): p. 1848-56.
- 238. Mempel, T.R., et al., *Visualization of leukocyte transendothelial and interstitial migration using reflected light oblique transillumination in intravital video microscopy*. J Vasc Res, 2003. **40**(5): p. 435-41.
- 239. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J Cell Biol, 1992. **119**(3): p. 493-501.
- 240. Grasl-Kraupp, B., et al., *In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note*. Hepatology, 1995. **21**(5): p. 1465-8.
- 241. Kinzel, L., et al., *A novel HSP90 inhibitor with reduced hepatotoxicity synergizes with radiotherapy to induce apoptosis, abrogate clonogenic*

- survival, and improve tumor control in models of colorectal cancer. Oncotarget, 2016. 7(28): p. 43199-43219.*
242. Gonias, S.L. and W.M. Campana, *LDL receptor-related protein-1: a regulator of inflammation in atherosclerosis, cancer, and injury to the nervous system. Am J Pathol, 2014. 184(1): p. 18-27.*
  243. May, P., *The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in inflammation. Curr Opin Lipidol, 2013. 24(2): p. 134-7.*
  244. Strickland, D.K., et al., *Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: role in the regulation of vascular integrity. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. 34(3): p. 487-98.*
  245. Massberg, S., et al., *Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. Blood, 1999. 94(11): p. 3829-38.*
  246. Okada, Y., et al., *Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. Stroke, 1994. 25(9): p. 1847-53; discussion 1853-4.*
  247. Pinsky, D.J., et al., *Coordinated induction of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and inhibition of plasminogen activator gene expression by hypoxia promotes pulmonary vascular fibrin deposition. J Clin Invest, 1998. 102(5): p. 919-28.*
  248. Eltzschig, H.K. and T. Eckle, *Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. Nat Med, 2011. 17(11): p. 1391-401.*
  249. Paigen, K., *A miracle enough: the power of mice. Nat Med, 1995. 1(3): p. 215-20.*
  250. Rossant, J. and C. McKerlie, *Mouse-based phenogenomics for modelling human disease. Trends Mol Med, 2001. 7(11): p. 502-7.*
  251. Waterston, R.H., et al., *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature, 2002. 420(6915): p. 520-62.*
  252. Carmeliet, P., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. II. Effects on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis. J Clin Invest, 1993. 92(6): p. 2756-60.*
  253. Bagher, P. and S.S. Segal, *The mouse cremaster muscle preparation for intravital imaging of the microcirculation. J Vis Exp, 2011(52).*

- 254. Khandoga, A.G., et al., *In vivo imaging and quantitative analysis of leukocyte directional migration and polarization in inflamed tissue*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4693.
- 255. Ng, L.G., et al., *Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites*. PLoS Pathog, 2008. **4**(11): p. e1000222.
- 256. Roediger, B., et al., *Visualizing dendritic cell migration within the skin*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(6): p. 1131-46.
- 257. Biberthaler, P., et al., *Ischemia at 4 degrees C: a novel mouse model to investigate the effect of hypothermia on postischemic hepatic microcirculatory injury*. Res Exp Med (Berl), 2001. **200**(2): p. 93-105.
- 258. Brown, M.F., et al., *Hepatic ischemia/reperfusion affects leukocyte rolling and velocity*. Clin Transplant, 1997. **11**(5 Pt 2): p. 511-5.
- 259. Khandoga, A., et al., *P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo*. Shock, 2002. **18**(6): p. 529-35.
- 260. Khandoga, A., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase triggers the microvascular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(3): p. G553-60.
- 261. Khandoga, A., et al., *Junctional adhesion molecule-A deficiency increases hepatic ischemia-reperfusion injury despite reduction of neutrophil transendothelial migration*. Blood, 2005. **106**(2): p. 725-33.
- 262. Holzer, M., et al., *Carbon-based nanomaterials accelerate arteriolar thrombus formation in the murine microcirculation independently of their shape*. J Appl Toxicol, 2014. **34**(11): p. 1167-76.
- 263. Pühr-Westerheide, D., et al., *Neutrophils promote venular thrombosis by shaping the rheological environment for platelet aggregation*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 15932.
- 264. Rumbaut, R.E., D.W. Slaff, and A.R. Burns, *Microvascular thrombosis models in venules and arterioles in vivo*. Microcirculation, 2005. **12**(3): p. 259-74.
- 265. Atkinson, B.T., et al., *Laser-induced endothelial cell activation supports fibrin formation*. Blood, 2010. **116**(22): p. 4675-83.

- 266. Ni, H., et al., *Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen*. J Clin Invest, 2000. **106**(3): p. 385-92.
- 267. Stackowicz, J., F. Jönsson, and L.L. Reber, *Mouse Models and Tools for the in vivo Study of Neutrophils*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 3130.
- 268. Duran-Struuck, R. and R.C. Dysko, *Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2009. **48**(1): p. 11-22.
- 269. Kuebler, W.M., et al., *A novel signaling mechanism between gas and blood compartments of the lung*. J Clin Invest, 2000. **105**(7): p. 905-13.
- 270. Massberg, S., et al., *Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin*. Blood, 1998. **92**(2): p. 507-15.
- 271. Cossarizza, A., et al., *Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies*. Eur J Immunol, 2017. **47**(10): p. 1584-1797.
- 272. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. Curr Protoc Immunol, 2018. **120**: p. 5.1.1-5.1.11.
- 273. Jonkman, J., et al., *Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy*. Nat Protoc, 2020. **15**(5): p. 1585-1611.
- 274. Hanrahan, O., J. Harris, and C. Egan, *Advanced microscopy: laser scanning confocal microscopy*. Methods Mol Biol, 2011. **784**: p. 169-80.
- 275. Elliott, A.D., *Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices*. Curr Protoc Cytom, 2020. **92**(1): p. e68.
- 276. Weckbach, L.T., et al., *The cytokine midkine supports neutrophil trafficking during acute inflammation by promoting adhesion via beta2 integrins (CD11/CD18)*. Blood, 2014. **123**(12): p. 1887-96.
- 277. DiStasi, M.R. and K. Ley, *Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability*. Trends Immunol, 2009. **30**(11): p. 547-56.
- 278. Nagai, N., et al., *Effects of plasminogen activator inhibitor-1 on ischemic brain injury in permanent and thrombotic middle cerebral artery occlusion models in mice*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(7): p. 1379-84.

- 279. Xu, Z., F.J. Castellino, and V.A. Ploplis, *Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is cardioprotective in mice by maintaining microvascular integrity and cardiac architecture*. Blood, 2010. **115**(10): p. 2038-47.
- 280. Watanabe, R., et al., *Effects of pharmacological suppression of plasminogen activator inhibitor-1 in myocardial remodeling after ischemia reperfusion injury*. Int Heart J, 2011. **52**(6): p. 388-92.
- 281. Eitzman, D.T., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin promote vascular thrombosis in mice*. Blood, 2000. **95**(2): p. 577-80.
- 282. Eren, M., et al., *Age-dependent spontaneous coronary arterial thrombosis in transgenic mice that express a stable form of human plasminogen activator inhibitor-1*. Circulation, 2002. **106**(4): p. 491-6.
- 283. Fernandez-Cadenas, I., et al., *Influence of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms on tissue-type plasminogen activator-induced recanalization in ischemic stroke patients*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(9): p. 1862-8.
- 284. Meltzer, M.E., et al., *Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1*. Blood, 2010. **116**(1): p. 113-21.
- 285. Thogersen, A.M., et al., *High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor*. Circulation, 1998. **98**(21): p. 2241-7.
- 286. Suzuki, Y., N. Nagai, and D. Collen, *Comparative effects of microplasmin and tissue-type plasminogen activator (tPA) on cerebral hemorrhage in a middle cerebral artery occlusion model in mice*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(9): p. 1617-21.
- 287. Fuchs, T.A., et al., *Extracellular DNA traps promote thrombosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(36): p. 15880-5.
- 288. von Bruhl, M.L., et al., *Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo*. J Exp Med, 2012. **209**(4): p. 819-35.

289. Praetner, M., et al., *Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promotes Neutrophil Infiltration and Tissue Injury on Ischemia-Reperfusion*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018. **38**(4): p. 829-842.



## **IX Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl als Institutsleiter a. D. und der aktuellen Institutsleiterin Frau Prof. Dr. Daphne Merkus, danke ich für die Aufnahme an das Walter-Brendel-Zentrums für experimentelle Medizin.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christoph A. Reichel sowie Prof. em. Dr. F. Krombach, unter deren Leitung ich diese Arbeit durchführen durfte. Durch sie habe ich Wissenschaftliches Arbeiten gelernt, von der Durchführung von Tierexperimenten und Datenerhebung, über die Auswertung und der korrekten Interpretation, bis hin zur Präsentation der Ergebnisse. Ihre Ideen und kompetenten Anregungen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke für die Geduld und das in mich gesetzte Vertrauen.

Besonders möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Krombach/Reichel für die schöne gemeinsame Zeit bedanken, vor allem bei Frau L. Padovan, Herrn Dr. D. Puhr-Westerheide, Herrn Dr. B. Uhl, Frau Dr. G. Zuchtriegel, Herrn Dr. M. Hessenauer, Frau Dr. L. Mittmann und Frau J. Schaubächer. Auch danke ich allen anderen Mitstreitern am Wbex für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und gegenseitige Motivation.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Tierhaltung des Instituts, die tierexperimentelles Arbeiten erst möglich machen.

Vielen Dank den Leitern des Graduiertenkolleg IRTG des Sonderforschungsbereichs 914 für die Aufnahme und Unterstützung während meiner experimentellen Doktorarbeit. Vielen Dank auch der medizinischen Fakultät der LMU für die Aufnahme in das Förderprogramm Forschung und Lehre (FöFoLe).

Zuletzt möchte ich meinen Großeltern, Eltern und Geschwistern, die mich immer unterstützt haben, vom ganzen Herzen danken.

## **X    Publikationen**

### **1    Aus der Dissertation hervorgegangene Publikationen**

1. Praetner M, Zuchtriegel G, Holzer M, Uhl B, Schaubächer J, Mittmann L, Fabritius M, Fürst R, Zahler S, Funken D, Lerchenberger M, Khandoga A, Kanse S, Lauber K, Krombach F, Reichel CA. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promotes Neutrophil Infiltration and Tissue Injury on Ischemia-Reperfusion. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2018.

### **2    Weitere Publikationen**

2. Uhl B, Zuchtriegel G, Puhr-Westerheide D, Praetner M, Rehberg M, Fabritius M, Hessenauer M, Holzer M, Khandoga A, Fürst R, Zahler S, Krombach F, Reichel CA. Tissue plasminogen activator promotes postischemic neutrophil recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2014.
3. Kunz WG, Schuler F, Sommer WH, Fabritius MP, Havla L, Meinel FG, Reiser MF, Ertl-Wagner B, Thierfelder KM. Wavelet-Based Angiographic Reconstruction of Computed Tomography Perfusion Data: Diagnostic Value in Cerebral Venous Sinus Thrombosis. **Invest Radiol.** 2017.
4. Fabritius MP, Thierfelder KM, Meinel FG, Othman AE, Dorn F, Sabel BO, Scheffler P, Ertl-Wagner B, Sommer WH, Kunz WG. Early Imaging Prediction of Malignant Cerebellar Edema Development in Acute Ischemic Stroke. **Stroke.** 2017.
5. Fabritius MP, Kazmierczak PM, Thierfelder KM, Kunz WG. Reversal of CT Hypodensity in Chronic Ischemic Stroke: A Different Kind of Fogging. **Clin Neuroradiol.** 2017.

6. Kunz WG, Sommer WH, Höhne C, Fabritius MP, Schuler F, Dorn F, Othman AE, Meinel FG, von Baumgarten L, Reiser MF, Ertl-Wagner B, Thierfelder KM. Crossed cerebellar diaschisis in acute ischemic stroke: Impact on morphologic and functional outcome. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2017.
7. Reidler P, Thierfelder KM, Fabritius MP, Sommer WH, Meinel FG, Dorn F, Wollenweber FA, Duering M, Kunz WG. Thalamic Diaschisis in Acute Ischemic Stroke: Occurrence, Perfusion Characteristics, and Impact on Outcome. **Stroke.** 2018.
8. Ingrisich M, Schöppe F, Paprottka K, Fabritius M, Strobl FF, De Toni EN, Ilhan H, Todica A, Michl M, Paprottka PM. Prediction of 90Y Radioembolization Outcome from Pretherapeutic Factors with Random Survival Forests. **J Nucl Med.** 2018.
9. Kunz WG, Fabritius MP, Sommer WH, Höhne C, Scheffler P, Rotkopf LT, Fendler WP, Sabel BO, Meinel FG, Dorn F, Ertl-Wagner B, Reiser MF, Thierfelder KM. Effect of stroke thrombolysis predicted by distal vessel occlusion detection. **Neurology.** 2018.
10. Froelich MF, Thierfelder KM, Rotkopf LT, Fabritius MP, Kellert L, Tiedt S, Sommer WH, Wollenweber FA, Dorn F, Liebig T, Reidler P, Kunz WG. Impact of Collateral Filling Delay on the Development of Subacute Complications After Acute Ischemic Stroke. **Clin Neuroradiol.** 2019.
11. Reidler P, Thierfelder KM, Rotkopf LT, Fabritius MP, Puhr-Westerheide D, Dorn F, Forkert ND, Kemmling A, Kunz WG. Attenuation Changes in ASPECTS Regions: A Surrogate for CT Perfusion-based Ischemic Core in Acute Ischemic Stroke. **Radiology.** 2019.

12. Schuler F, Rotkopf LT, Apel D, Fabritius MP, Tiedt S, Wollenweber FA, Kellert L, Dorn F, Liebig T, Thierfelder KM, Kunz WG. Differential Benefit of Collaterals for Stroke Patients Treated with Thrombolysis or Supportive Care : A Propensity Score Matched Analysis. **Clin Neuroradiol.** 2019.
13. Puhr-Westerheide D, Tiedt S, Rotkopf LT, Herzberg M, Reidler P, Fabritius MP, Kazmierczak PM, Kellert L, Feil K, Thierfelder KM, Dorn F, Liebig T, Wollenweber FA and Kunz WG. Clinical and Imaging Parameters Associated with Hyperacute Infarction Growth in Large Vessel Occlusion Stroke. **Stroke.** 2019.
14. Puhr-Westerheide D, Schink SJ, Fabritius M, Mittmann L, Hessenauer MET, Pircher J, Zuchtriegel G, Uhl B, Holzer M, Massberg S, Krombach F and Reichel CA. Neutrophils promote venular thrombosis by shaping the rheological environment for platelet aggregation. **Sci Rep.** 2019.
15. Fabritius MP, Reidler P, Froelich MF, Rotkopf LT, Liebig T, Kellert L, Feil K, Tiedt S, Kazmierczak PM, Thierfelder KM, Puhr-Westerheide D and Kunz WG. Incremental Value of Computed Tomography Perfusion for Final Infarct Prediction in Acute Ischemic Cerebellar Stroke. **J Am Heart Assoc.** 2019.
16. Reidler P, Mueller F, Stueckelschweiger L, Feil K, Kellert L, Fabritius MP, Liebig T, Tiedt S, Puhr-Westerheide D, Kunz WG. Diaschisis Revisited: Quantitative Evaluation of Thalamic Hypoperfusion in Anterior Circulation Stroke. **NeuroImage: Clinical.** 2020.
17. Reidler P, Puhr-Westerheide D, Rotkopf L, Fabritius MP, Feil K, Kellert L, Tiedt S, Rémi J, Liebig T, Kunz WG. Cerebral Attenuation on Single-phase CT Angiography Source Images: Automated Ischemia Detection and Morphologic Outcome Prediction after Thrombectomy in Patients with Ischemic Stroke. **PloS one.** 2020.

18. Schütte K, Schinner R, Fabritius MP, Möller M, Kuhl C, Iezzi R, Pech M, Peynircioglu B, Sharma R, Palmer D, Bronowicki J-P, Reimer P, Malfertheiner P, Ricke J. Impact of extrahepatic metastases on overall survival in patients with advanced liver dominant hepatocellular carcinoma – a subanalysis of the SORAMIC trial. **Liver Cancer**. 2020.
19. Schwarze V, Rübenthaler R, Marschner C, Fabritius MP, Rueckel J, Fink N, Puhr-Westerheide D, Gresser E, Froelich MF, Schnitzer ML, Große Hokamp N, Afat S, Staehler M, Geyer T, Clevert D-A. Advanced Fusion Imaging and Contrast-Enhanced Imaging (CT/MRI – CEUS) in Oncology. **Cancers**. 2020.
20. Reidler P, Stueckelschweiger L, Puhr-Westerheide, Feil K, Kellert L, Dimitriadis K, Tiedt S, Herzberg M, Rémi J, Liebig T, Fabritius MP, Kunz WG. Performance of Automated Attenuation Measurements at Identifying Large Vessel Occlusion Stroke on CT Angiography. **Clinical Neuroradiology**. 2020.